

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRUNO BOËCHAT MACIEL

ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO DE GATO

CURITIBA

2010

BRUNO BOËCHAT MACIEL

ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSEO DE GATO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração Patologia Animal, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientadora: Profa. Dra. Rosangela Locatelli Dittrich.

Co-orientadora: Dra. Carmen L. Kuniyoshi Rebelatto

CURITIBA

2010

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



PARECER

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação intitulada **"ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO ADIPOSE DE GATO"** apresentado pelo Mestrando BRUNO BOËCHAT MACIEL, declara ante os méritos demonstrados pelo Candidato, e de acordo com o Art. 79 da Resolução nº 65/09-CEPE /UFPR, que considerou o candidato APTO para receber o Título de Mestre em Ciências Veterinárias, na Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

Curitiba, 25 de fevereiro de 2010

Professora Dr^a Rosângela Locatelli Dittrich
Presidente/Orientadora

Professor Dr. Fabiano Montiani Ferreira
Membro

Professora Dra. Alexandra Cristina Benegaglia
Membro

Dra. Carmen Lúcia Kuniyoshi Rebelatto
Co-Orientadora

***A MINHA FAMÍLIA, AMIGOS E ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO DEDICO TODO O MEU
ESFORÇO...***

Agradecimentos

Agradeço a todos que estiveram presentes nessa etapa tão importante da vida.

Aos mestres, doutores, biólogos, alunos e cada pessoa que de alguma forma me ajudou, com críticas ou com apoio sincero.

Agradeço muito a minha família por tudo que representam.

Mesmo que ela não entenda agradeço especialmente a minha cadelinha Ferrugi, pelo seu amor incondicional, lealdade e companhia nas madrugadas que passei em frente ao computador.

Às minha orientadoras Rosangela Locatelli Dittrich e Carmen Rebelatto pelos ensinamentos . Por aqui expresso minha eterna admiração e gratidão.

Agradeço ao Laboratório Experimental de Cultivo Celular da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Às pesquisadoras Alexandra Senegaglia, Paula Hansen, Fabiane Barchiki e ao Doutor Paulo Brofman pelos ensinamentos e acolhimento de forma tão gentil.

A clínica veterinária Mania de Gato, em especial a Dra. Marúcia Andrade Cruz e a Madrinha. Pela amizade e apoio fundamental à pesquisa.

A Universidade Federal do Paraná pelo fundamental apoio institucional e financeiro para a realização desse projeto.

“Há pessoas que desejam saber só por saber, e isso é curiosidade;
outras, para alcançarem a fama, e isso é vaidade; outras, para
enriquecerem com a sua ciência, e isso é um negócio torpe; outras, para
serem edificadas, e isso é prudência; outras, para edificar os outros, e
isso é caridade”

(S. Tomás de Aquino)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
3 COMPONENTES DA ENGENHARIA TECIDUAL COM APLICAÇÕES NA ORTOPEDIA – REVISÃO.....	12
3.1 INTRODUÇÃO.....	14
3.2 HISTÓRIA DA ENGENHARIA TECIDUAL.....	15
3.3 ENGENHARIA TECIDUAL – CONCEITOS.....	17
3.4 ENXERTOS ÓSSEOS NAS AFECÇÕES ORTOPÉDICAS.....	17
3.5 DEFEITOS ÓSSEOS CRÍTICOS.....	19
3.6 TERAPIA CELULAR.....	22
3.7 CITOCINAS.....	27
3.8 ESTRADOS.....	29
4 CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO I - ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E TECIDO ADIPOSE DE GATO.....	45
RESUMO.....	46
ABSTRACT.....	46
1 INTRODUÇÃO.....	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	51
2.1 ANIMAIS.....	51

2.2 AMOSTRAS.....	51
2.2.1 MEDULA ÓSSEA.....	51
2.2.2 TECIDO ADIPOSEO.....	52
2.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CULTURA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS.....	52
2.3.1 MEDULA ÓSSEA.....	52
2.3.2 TECIDO ADIPOSEO.....	54
2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS E VIABILIDADE CELULAR.....	55
2.5 MORFOLOGIA CELULAR.....	55
2.6 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS.....	56
2.6.1 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA.....	57
2.6.2 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA.....	57
2.6.3 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA.....	58
2.7 DETERMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE.....	59
2.8 ENSAIO CLONOGÊNICO E CONTAGEM DE UFC-F.....	60
3 RESULTADOS.....	61
4 DISCUSSÃO.....	92
5 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 – INTRODUÇÃO GERAL

A grande capacidade e potencial de diferenciação das células tronco mesenquimais (CTMs), a possibilidade de enxerto, seus efeitos imunossupressores e sua expansão em cultura levaram ao aumento do interesse clínico relativo ao uso destas células, através de infusão intravenosa ou administração dirigida ao local de interesse, em numerosas situações patológicas (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). As células são consideradas componente crucial da engenharia tecidual (KWAN *et al.*, 2007). O uso das CTMs como ferramentas de engenharia tecidual já é uma realidade (BIANCO *et al.*, 2006). Porém, antes do uso clínico das CTMs, vários estudos devem ser realizados, porque existe poucas informações sobre os efeitos em longo prazo deste tipo de terapia e sobre o efeito da terapia celular em cada indivíduo (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

A engenharia tecidual, disciplina científica moderna, é dedicada a geração de tecidos usando os princípios de engenharia em conjunto com a compreensão e aplicação de ciências biológicas. Seus principais objetivos são projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos. Produzir e inventar materiais sintéticos que podem servir de carreadores das células e a descoberta e produção de mediadores biológicos (VACANTI, 2006).

As citocinas envolvidas no processo de formação dos tecidos e os materiais que serão os carreadores das células e dos mediadores biológicos também possuem papel fundamental nas pesquisas e possíveis aplicações clínicas. As metas a serem alcançadas em engenharia tecidual ortopédica são o uso de células e citocinas osteogênicas via estrado biologicamente ativo, para que se alcance uma cicatrização de um defeito ósseo de maneira mais acelerada (KWAN *et al.*, 2007).

Nos animais a caracterização morfológica e biológica das CTMs são importantes para o uso clínico dessas células. Estudos sobre isolamento, cultivo, expansão, diferenciação, imunofenotipagem e morfologia devem ser realizados para o desenvolvimento de um possível “fármaco celular”. As características do doador, a morfologia e morfometria celular, o potencial funcional, a determinação da segurança microbiológica e a verificação da ausência de transformação durante o processo de cultura são outros pontos fundamentais a serem abordados em estudos pré-clínicos utilizando estas células.

Esse trabalho está dividido em duas partes. Na primeira é feita uma revisão sobre a engenharia tecidual aplicada na ortopedia, possível aplicação imediata das células usadas no experimento aqui apresentado. Na segunda parte está descrito o experimento “Isolamento, Cultivo e Caracterização de Células Tronco Mesenquimais da Medula Óssea e do Tecido Adiposo de Gato”, apresentado sobre a forma de artigo científico.

2 – OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Isolar, cultivar e caracterizar as células tronco mesenquimais isoladas da medula óssea e do tecido adiposo de gatos.

2.2 Objetivos específicos

- Padronizar um protocolo de isolamento e cultivo de células tronco mesenquimais da medula óssea e do tecido adiposo;
- Induzir a diferenciação das células tronco mesenquimais de gatos em osteoblastos, condrócitos e adipócitos;.
- Analisar morfolologicamente e morfometricamente as células tronco mesenquimais;
- Caracterizar imunofenotipicamente as células tronco mesenquimais.

3 - COMPONENTES DA ENGENHARIA TECIDUAL COM APLICAÇÕES NA ORTOPEDIA – REVISÃO

(tissue engineering components with applications in orthopaedics – review)

RESUMO: A engenharia tecidual, disciplina científica moderna, tem como objetivos a geração e a manipulação de tecidos vivos, produção e invenção de materiais sintéticos (estrados) que irão carrear esses tecidos e a descoberta e produção de mediadores biológicos. No início dos anos 70 alguns pesquisadores nos Estados Unidos plantaram as primeiras sementes, do que é hoje a engenharia tecidual moderna. Com o auge no desenvolvimento na ciência de materiais, engenharia biológica, biologia das células tronco, e biologia molecular, o potencial da engenharia tecidual de auxiliar na medicina regenerativa é enorme. As pesquisas com defeitos ósseos críticos permitem que a performance, dosagens, e combinações de várias fontes de células, citocinas osteogênicas, e estrados sejam avaliados. As células são um componente crucial da engenharia tecidual esquelética, sendo as células tronco adultas muito promissoras. Alguns estudos já demonstraram a eficácia de células-tronco mesenquimais no tratamento de defeitos ósseos críticos. O estudo da formação óssea revelou alguns fatores de crescimento envolvidos nesse processo. A identificação das citocinas que agem especificamente na formação óssea e como utilizá-las é outro ponto-chave da engenharia tecidual. Em pesquisas paralelas onde está se procurando a célula osteoprogenitora ideal e a identificação de citocinas com potencial para o uso na engenharia tecidual esquelética, avanços na ciência de materiais forneceram uma abundância de inovações no desenvolvimento de um carreador (estrado) apropriado para essas células e moléculas. Os materiais utilizados podem ser naturais, minerais e polímeros sintéticos. As metas a serem alcançadas são o uso de células e citocinas osteogênicas via um estrado

biologicamente ativo, para que se alcance uma cicatrização de um defeito ósseo de maneira mais acelerada. Esta revisão aborda aspectos atuais da engenharia tecidual esquelética, decorrendo sobre as pesquisas com defeitos ósseos críticos, terapia celular e estrados.

Palavras-chave: células-tronco, citocinas, estrados, defeitos ósseos críticos

ABSTRACT: Tissue engineering, a modern scientific discipline, aims at the generation and manipulation of living tissues, production and invention of synthetic materials (scaffolds) that will carry these tissues and the discovery and production of biological mediators. In the early 70s some researchers in the U.S. planted the first seeds of what is now the modern tissue engineering. With the boom in development in materials science as well as biological engineering, stem cell biology and molecular biology, the potential of tissue engineering to assist in regenerative medicine is enormous. The studies with critical sized bone defects allow the performance, doses, and combinations of various sources of cells, osteogenic cytokines, and scaffolds to be assessed. The cells are a crucial component of skeletal tissue engineering, and the multipotent stem cells are the most promising. Some studies have shown the efficacy of mesenchymal stem cells to treat critical bone defects. The study of bone formation showed some growth factors involved in this process. The identification of cytokines that act specifically on bone formation and how to use them is another key point in tissue engineering. In parallel search which is looking for ideal osteoprogenitor cells and identification of cytokines with potential for use in skeletal tissue engineering, advances in materials science provided a wealth of innovations in the development of a carrier (scaffold) suitable for these cells and molecules. The materials can be natural, mineral and synthetic polymers. The goals to be achieved are the use of cells and osteogenic cytokines via

a biologically active scaffold, to achieve a healing of a bone defect in a more accelerated way. This review covers current aspects of skeletal tissue engineering, held on the studies with critical sized bone defects, cell therapy and scaffolds.

Key words: stem cells, cytokines, scaffolds, critical sized bone defects

3.1 INTRODUÇÃO

A cicatrização de fraturas geralmente ocorre quando os componentes biológico e mecânico adequados estão presentes. Técnicas e implantes inovadores permitem aos cirurgiões o reparo de fraturas complexas com sucesso. Apesar disso, algumas complicações podem ocorrer com o reparo e a conseqüente cicatrização de fraturas, incluindo osteomielite, perda do implante e instabilidade da fratura. Todas essas complicações podem resultar em união-retardada, não-união, ou má-união da fratura e qualquer dessas três complicações podem ocorrer se as regras de fixação de fraturas não forem seguidas (MILLIS e JACKSON, 2003). Tanto união-retardada como não-união são problemas comuns na prática clínica de cães e gatos (REMEDYOS, 1999).

Os principais objetivos da engenharia tecidual são projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos, produção e invenção de materiais sintéticos que vão servir de carreadores das células, descoberta e produção de mediadores biológicos (VACANTI, 2006).

A medicina regenerativa oferece uma opção estimulante para o tratamento de defeitos ósseos. Com o auge no desenvolvimento na ciência de materiais, engenharia biológica, biologia das células tronco e biologia molecular, o potencial da engenharia tecidual de acelerar a regeneração óssea tornou-se uma possibilidade distinta (KWAN *et al.*, 2007).

Os defeitos ósseos críticos são modelos experimentais onde a falha óssea produzida não é capaz de regenerar. São importantes para a avaliação de componentes fundamentais das pesquisas na área de engenharia tecidual esquelética. As células, fatores de crescimento e materiais para o carregamento desses componentes são testados nesses modelos, o que permite avaliar diferentes “construções” para que se obtenha uma cicatrização óssea mais rápida (BODDE *et al.*, 2008).

Provavelmente, as células são o componente mais crucial da engenharia tecidual esquelética, mas as citocinas envolvidas no processo de formação óssea e os materiais que serão os carreadores das células e dos mediadores biológicos também possuem papel fundamental nas pesquisas e possíveis aplicações clínicas. As metas a serem alcançadas são o uso de células e citocinas osteogênicas via um estrado biologicamente ativo, para que se alcance uma cicatrização de um defeito ósseo em uma maneira mais acelerada (KWAN *et al.*, 2007; VACANTI, 2006).

O objetivo dessa revisão é demonstrar os componentes fundamentais da engenharia tecidual esquelética, considerando as técnicas atuais utilizadas em pesquisa e fornecer uma visão mais detalhada de três fatores fundamentais: terapia celular, mediadores biológicos e materiais carreadores (estrados).

3.2 História da engenharia tecidual

A famosa pintura do Frei Angeliac , "Cura de Justiniano" (Figura 1) ilustrando os irmãos São Cosme e Damião transplantando um enxerto alógeno de uma perna, para um soldado ferido, é muitas vezes referida como a primeira referência histórica a "engenharia tecidual". No entanto, Gênesis I: 1 "O Senhor, fazia-o respirar profundamente, e o punha para dormir e enquanto ele estava dormindo ele tirou - uma de suas costelas e fechou o seu lugar com músculo. O Senhor Deus então

construíu a mulher de uma costela que ele tinha retirado do homem "[2], pode ser interpretado como a mais antiga referência escrita (VACANTI, 2006).



Figura 1 - Pintura do Frei Angeliac , "Cura de Justiniano" irmãos São Cosme e Damião transplantando um enxerto alógeno de uma perna, para um soldado ferido.
(<http://www.google.com.br/imgres>)

Com a introdução do método científico veio uma nova compreensão do mundo natural. Os segredos da biologia foram conjugados com a compreensão científica da doença e do trauma. Próteses para a substituição de membros, dentes, e de outros tecidos resultou na recuperação parcial das perdas de função. Além disso, o conceito de usar um tecido para substituir outro foi desenvolvido (VACANTI e VACANTI, 2007).

Os primeiros dois artigos fazendo referências a engenharia tecidual tal qual é definida nos dias de hoje foram: o primeiro em 1988, intitulado *Beyond transplantation*, no periódico *Archives in Surgery* (VACANTI, 1988) e cinco anos mais tarde que teve maior repercussão intitulado *Tissue Engineering*, publicado na revista *Science* (LANGER e VACANTI, 1993).

3.3 - Engenharia Tecidual: Conceitos

A engenharia tecidual, disciplina científica moderna, é dedicada a geração de tecidos usando os princípios de engenharia em conjunto com a compreensão e aplicação de ciências biológicas. Seus principais objetivos são:

- Projetar, produzir, modificar, expandir e manter tecidos vivos.
- Produzir e inventar materiais sintéticos que servirão de carreadores das células.
- Descobrir e produzir mediadores biológicos (VACANTI, 2006).

3.4 - Enxertos ósseos nas afecções ortopédicas

Os clínicos confrontam-se com uma variedade de grandes defeitos ósseos resultantes de trauma, excisão de tumores malignos, não-união de fraturas, e malformações congênitas. Os enxertos autógenos continuam sendo a melhor opção para a reconstrução de defeitos ósseos porque eles fornecem células osteogênicas, fatores osteoindutores e osteocondução necessários para a regeneração óssea (KWAN *et al.*, 2007). Osteocondutividade refere-se a habilidade do enxerto de suportar a aderência das células e permitir migração de novas células e formação de vasos (Figura 2). A osteoindutividade refere-se a habilidade de induzir células-tronco não diferenciadas ou células progenitoras a se transformar em células da linhagem osteogênica (MILLIS & MARTINEZ, 2003; PIERMATTEI *et al.*, 2006).



Figura 2 – Representação do processo de osteocondução. A figura a direita mostra a invasão de tecido e vasos no estrado de hidróxiapatita. (AUER & FACKELMAN, 2000).

Os locais para a coleta de enxerto ósseo autógeno em cães e gatos são: tubérculo maior do úmero, crista ilíaca, porção proximal da tíbia (MILLIS & MARTINEZ, 2003; JOHNSON & DUNNING, 2005; PIERMATTEI *et al.*, 2006; JOHNSON, 2007) e tuberosidade do ísquio (MILLIS & MARTINEZ, 2003). Em eqüinos os locais de coleta são a porção proximal da tíbia, crista ilíaca e esterno (FACKELMAN & AUER, 2000). Enxertos autógenos, entretanto, sujeitam o paciente aos riscos inerentes a cirurgia de coleta. Em um estudo retrospectivo de enxertos autógenos coletados da crista ilíaca de seres humanos, uma taxa de complicação de perto de 10 % foi observada, incluindo infecção, fratura, grandes hematomas, dor, parestesia e lesão de nervo (YOUNGER & CHAPMAN, 1989). Os enxertos autógenos também são uma fonte relativamente escassa e são limitados pela quantidade de osso que pode ser removida sem causar morbidade no local de coleta.

Em situações onde os enxertos autógenos não são suficientes ou possíveis, osso alógeno, de doadores ou cadáveres, pode ser usado. O enxerto alógeno é aquele coletado de um indivíduo e transplantando para outro da mesma espécie (MILLIS & MARTINEZ, 2003; PIERMATTEI *et al.*, 2006). Este tipo de enxerto pode

ser usado na hora da coleta, ou estocado em banco de ossos por meio do congelamento, congelamento-seco, irradiação ou tratamento químico para uso posterior (MILLIS & MARTINEZ, 2003). Clinicamente o enxerto alógeno possui o mesmo efeito positivo do enxerto autógeno, porém a osteogênese direta não ocorre e a resposta clínica tem atraso de duas semanas quando comparado ao enxerto autógeno. A maior vantagem de um enxerto alógeno é a disponibilidade em quantidade, forma e tamanho. Também é a única possibilidade de grande enxerto cortical (PIERMATTEI *et al.*, 2006). No entanto, o uso de enxertos alógenos é acompanhado por riscos como a transmissão de doenças, rejeição imunológica e a doença do enxerto contra hospedeiro (KWAN *et al.*, 2007).

Um enxerto xenógeno envolve a transferência de tecidos de indivíduos de espécies diferentes (MILLIS & MARTINEZ, 2003; PIERMATTEI *et al.*, 2006). Isoenxertos são tecidos transplantados de um indivíduo para outro geneticamente idêntico (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

3.5 Defeitos ósseos críticos

Na pesquisa por elementos ótimos para avaliar o sucesso da engenharia tecidual ortopédica, os defeitos ósseos críticos demonstraram ser ferramenta indispensável para a avaliação da performance de várias construções em estudo *in vivo*. Defeitos ósseos críticos são defeitos ósseos que falham em cicatrizar sem intervenção cirúrgica (KWAN *et al.*, 2007) ou aqueles defeitos onde a regeneração óssea ocorreu em apenas 10% da área do defeito (BODDE *et al.*, 2008). Eles permitem que a eficiência, dosagens e combinações de várias fontes de células, citocinas osteogênicas e estrados, sejam avaliados.

A eficácia dos substitutos de enxerto ósseo na regeneração óssea, pode ser comprovada quando os materiais superam as falhas ósseas de defeitos ósseos de

dimensões críticas. Vários modelos de defeitos ósseos críticos em diferentes espécies animais já foram descritos, cada um com a sua própria aplicação específica. Por exemplo, defeitos calvários em ratos e coelhos proporcionam bons modelos biológicos para uma primeira fase, onde não há cargas mecânicas, com relativa inatividade, devido à deficiência do suprimento sanguíneo e a quantidade limitada de medula óssea, assemelhando-se a mandíbula atrófica em humanos (KWAN *et al.*, 2007).

Um bom local para estudar a regeneração de defeitos ósseos segmentares longos é a diáfise do rádio de coelhos. Este modelo não necessita de fixação interna ou imobilização externa, já que a ulna adjacente intacta proporciona estabilidade ao defeito criado no rádio. Por conseguinte, o tempo cirúrgico e os custos são minimizados e o risco de infecção é reduzido. Para a primeira fase da investigação, antes da implantação em grandes animais, os coelhos são interessantes como animais de experimentação, já que seus ossos são grandes o suficiente para avaliar as propriedades de manipulação dos materiais em comparação aos ratos, por exemplo (figura 3) (BODDE *et al.*, 2008).



Figura 3 – Defeito ósseo crítico na diáfise do rádio de um coelho. O defeito foi preenchido com um estrado a base de ácido láctico poliglicólico e carboximetilcelulose. (BODDE *et al.*, 2008).

Os modelos de defeitos ósseos críticos permitem exames radiográficos seriados, utilizando-se modalidades como a microtomografia computadorizada (figura 4) (BODDE *et al.*, 2008). No entanto, ultimamente a histologia tem sido a ferramenta padrão ouro para a avaliação da eficácia das construções. A análise histomorfométrica é usada para a avaliação da quantidade de osso formado. A histologia também permite a avaliação da reabsorção óssea, mudanças na estrutura endógena e a qualidade da regeneração óssea (SALGADO *et al.*, 2004). Servindo como um módulo de avaliação *in vivo* da regeneração óssea, defeitos ósseos críticos permitem que os pesquisadores avaliem a taxa e o grau da cicatrização óssea para componentes individuais de uma construção óssea e também seus efeitos no processo de cicatrização (COWAN *et al.*, 2005).

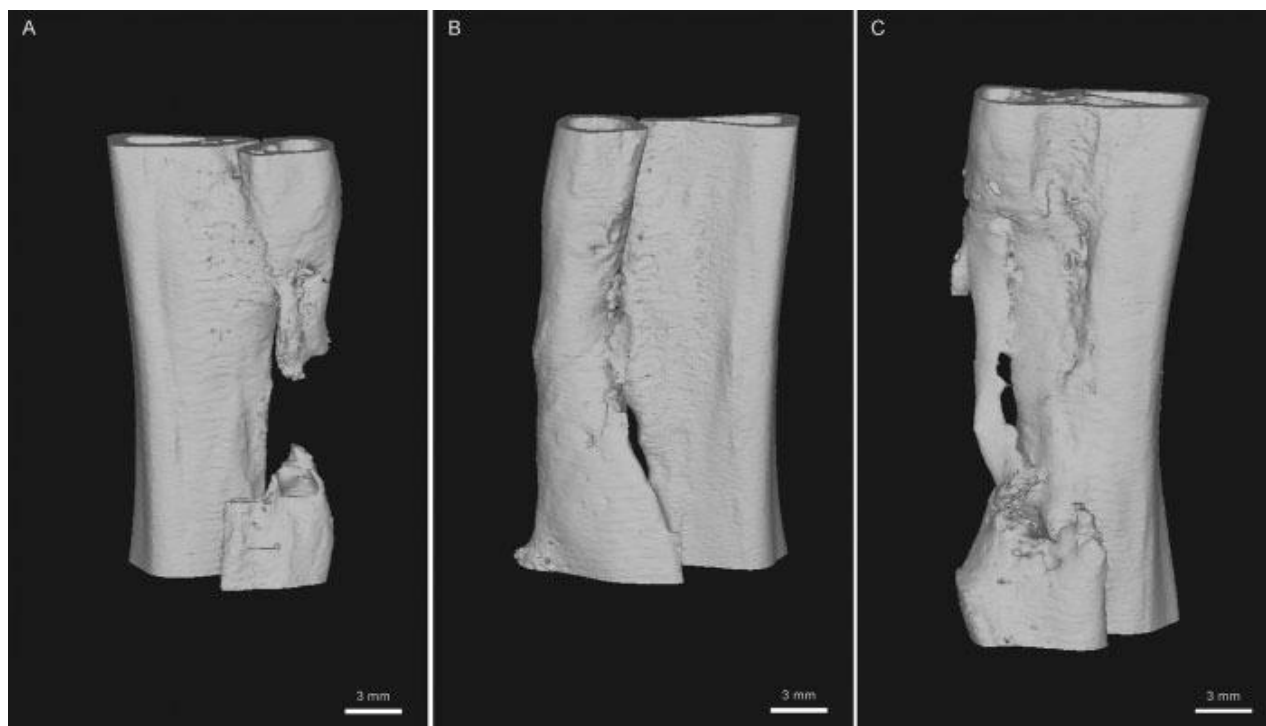


Figura 4 – Imagens de microtomografia computadorizada com 12 semanas após o início do experimento. Diferentes respostas na regeneração óssea podem ser observadas. (A) não-união atrófica, (B) consolidação normal (C) formação atípica de calo em ponte. Esse tipo de detalhe não é observado em radiografias simples em duas dimensões (BODDE *et al.*, 2008).

3.6 - Terapia celular

As células são componentes cruciais da engenharia tecidual esquelética. As duas categorias de populações celulares disponíveis como fonte de células osteoprogenitoras incluem os osteoblastos e as células tronco. À primeira vista, poderia se imaginar que o osteoblasto seria um candidato para a engenharia tecidual esquelética. Estas células já estão comprometidas com a linhagem óssea e já formam matriz mineralizada. Além disso, devido à quantidade limitada de células disponíveis, sua baixa taxa de expansão e a morbidade do local doador, a população de osteoblastos não é uma fonte de células ideal para a engenharia tecidual esquelética (KWAN *et al.*, 2007).

O termo células tronco, do inglês *stem cell*, diz respeito a células precursoras que possuem a capacidade de auto renovação ilimitada e diferenciação, podendo

dar origem a uma variedade de tipos teciduais tais como osso, tecido adiposo, muscular, neuronal, entre outros (WATT & HOGAN, 2000; BERNÁ, 2001; ODORICO *et al.*, 2001; GRITTI *et al.*, 2002).

As células tronco estão presentes no embrião, quando são designadas células tronco embrionárias, mas podem também ser encontradas em tecidos adultos, denominadas de células-tronco adultas (VOGEL, 2000). As células tronco aparecem como a opção mais promissora para a medicina regenerativa. A habilidade das células tronco embrionárias de murinos em se diferenciar em osteoblastos e ossos foi demonstrado *in vitro* na presença da dexametasona (BUTTERY *et al.*, 2001). Entretanto, devido a controvérsias políticas e éticas que cercam o uso de células tronco embrionárias, os pesquisadores focaram suas atenções em fontes de células tronco multipotentes pós-natais (KWAN *et al.*, 2007).

Poucos anos após a descoberta das células tronco hematopoéticas, na década de 60, os estudos de Friedestein e colaboradores e mais tarde de Owen e Friedestein, revelaram a existência de progenitores multipotentes, na medula óssea pós-natal, com grande potencial para dar origem à múltiplos e distintos tecidos mesodermiais (FRIEDESTEIN *et al.*, 1966 ; OWEN & FRIEDESTEIN, 1988).

A partir dessas descobertas, reconheceu-se a existência de dois sistemas distintos na medula óssea – o sistema hematopoiético composto pelos progenitores que irão se diferenciar em todos os fenótipos celulares maduros do sangue, e o sistema estromal, este último sendo o precursor das linhagens osteogênica, condrogênica, adipocítica, fibroblástica e de suporte estromal, a partir de um progenitor comum (BIANCO & ROBEY, 2004). De 1968 a 1972 o laboratório do Doutor Arnold Caplan em Cleveland, desenvolveu e refinou métodos para o isolamento e cultura de células mesenquimais indiferenciadas, originadas das

células germinativas dos membros de embriões de frango de quatro a cinco dias de idade. Essas células se multiplicavam em cultura e, dependendo das condições do cultivo e da densidade inicial no plaqueamento, elas se diferenciavam em músculo, cartilagem, ossos e vários outros tecidos conectivos. Quando havia uma densidade média nas placas de cultivo, havia o desenvolvimento de osteoblastos. Em uma densidade 2,5 vezes maior nas placas de cultivos dessas mesmas células, havia a formação de cartilagem com pouca ou nenhuma evidência de diferenciação em osteoblastos (CAPLAN, 2006).

Após essas descobertas no final do século passado, alguns trabalhos já demonstraram a habilidade das CTMs em se diferenciar em osso, cartilagem, músculo, ligamentos, tendões e estroma (KWAN *et al.*, 2007).

A natureza estromal das CTMs pode ser caracterizada pela rápida aderência dessas células após o plaqueamento da medula óssea em baixa densidade celular. Essas células aderentes, chamadas de CFU-F (*colony forming unit – fibroblasts*) proliferam e estabelecem colônias. Após a expansão *ex vivo*, elas têm a capacidade de gerar osso e compartimento medular estromal quando transplantadas para um sistema *in vivo* (KREBSBACH *et al.*, 1997) e cartilagem, osso, tecido fibroso e gordura quando transplantadas para um sistema *in vivo* fechado (ASHTON *et al.*, 1980; FRIEDESTEIN *et al.*, 1970).

As células tronco mesenquimais já foram isoladas do sangue de cordão umbilical humano (LEE *et al.*, 2004; KOGLER *et al.*, 2004) sangue (TUAN *et al.*, 2003), derme (CRIGLER *et al.*, 2007), osso trabecular (NOTH *et al.*, 2002) pulmão (SABATINI *et al.*, 2005), polpa de dentes e ligamento periodontal (SHI *et al.*, 2005), sugerindo que estas células estão ampla e diversamente distribuídas *in vivo*.

A osteogênese *in vitro* das CTMs obtidas da medula óssea de frangos, camundongos, ratos, coelhos, porcos (JAISWAL *et al.*, 1997), seres humanos (MAJORS *et al.*, 1997), cavalos (ARNHOLD *et al.*, 2007), cães (VOLK *et al.*, 2005) e gatos (MARTIN *et al.*, 2002) em resposta a diversos fatores bioativos incluindo osteogenina, proteína morfogenética óssea-2 (BMP-2), peptídeos de crescimento osteogênico, glicocorticóide sintético dexametasona (JAISWAL *et al.*, 1997), ácido ascórbico, β glicerolfosfato (KWAN *et al.*, 2007) e o flavonóides da erva *Herba Epimedii* (ZHANG *et al.*, 2009) já foi demonstrada.

O uso das CTMs na engenharia tecidual esquelética foi demonstrado em múltiplos modelos animais. Oghushi e colaboradores (1989) implantaram células da medula óssea autóloga em estrados compostos de cerâmica de cálcio fosfato em defeitos ósseos críticos de fêmur de ratos. Eles demonstraram uma alta taxa de união óssea completa e acelerada cicatrização no grupo em que se utilizou células da medula óssea comparados ao grupo controle. Resultados similares foram encontrados por Bruder e colaboradores (1998) que usando CTMs obtidas da medula óssea de seres humanos, carregadas em estrado de cerâmica e aplicadas em defeitos ósseos críticos de fêmures de ratos atímicos, demonstraram, por meio de radiografias de alta resolução, imunohistoquímica e histomorfometria quantitativa, a formação de osso novo à partir de oito semanas. A avaliação biomecânica demonstrou que fêmures que receberam o estrado de cerâmica com as células foram significativamente mais fortes comparativamente aos que receberam apenas o estrado de cerâmica.

CTMs alógenas carregadas em estrados de hidroxiapatita, foram capazes de acelerar o processo de cicatrização óssea em defeitos ósseos críticos de fêmures de

cães adultos, comparados ao grupo controle, sem o uso de imunossupressão. A regeneração completa ocorreu em 16 semanas (Figura 6) (ARINZEH *et al.*, 2003).

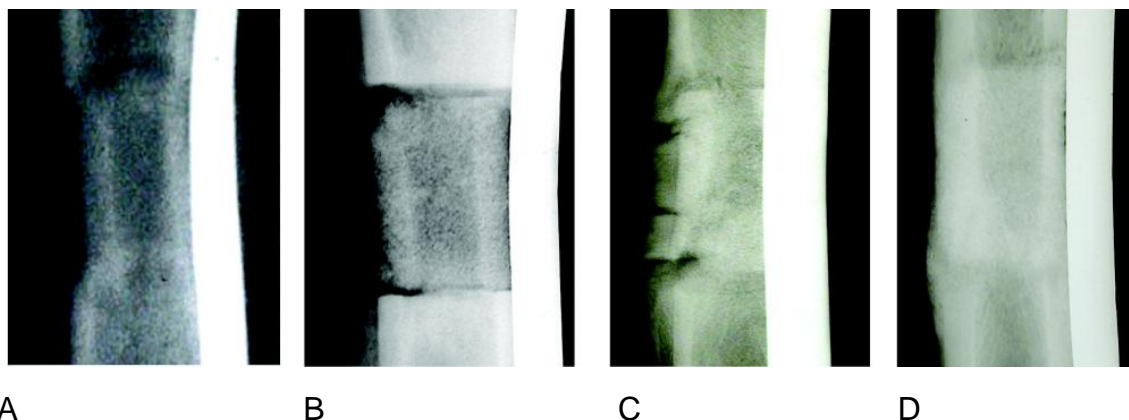


FIGURA 6 – Vistas radiográficas do processo de cicatrização óssea em fêmures de cães que receberam tratamento com a utilização de células-tronco mesenquimais alógenas em estrados de hidróxido apatita. A) Pós-operatório, B) Quatro semanas pós cirurgia, C) Oito semanas pós cirurgia, D) 16 semanas pós-cirurgia (ARINZEH *et al.*, 2003).

Apesar da atratividade das CTMs para o uso na engenharia tecidual, existe um fator limitante que é a baixa frequência dessas células no estroma da medula óssea. A análise de aspirados de medula óssea de seres humanos encontrou que a incidência das CTMs pode ser menor que 1/27000 células (BANFI *et al.*, 2000). Além disso, o procedimento para a obtenção da medula óssea é doloroso, necessitando de anestesia local ou geral. (KWAN *et al.*, 2007).

As CTMs derivadas do tecido adiposo são especialmente atrativas devido a sua fácil obtenção em grandes quantidades em uma única coleta, a grande frequência (0,5%) e a rápida expansão *in vitro* (UGARTI, *et al.*, 2003). Estas células constituem uma população heterogênea e dependendo da fonte da qual são obtidas apresentam diferentes expressões gênicas (MURAGLIA *et al.*, 2001). Desta forma, estudos para se definir a melhor fonte de CTMs, com o maior potencial para diferenciação osteogênica, para serem utilizadas na engenharia tecidual esquelética devem ser realizados.

3.7 - Citocinas

O estudo da formação óssea na biologia do desenvolvimento e na osteogênese revelou uma gama de fatores de crescimento envolvidos nesse processo. As pesquisas com essas citocinas forneceram muitas informações no efeito dessas moléculas sinalizadoras na proliferação celular, diferenciação, adesão, migração, e por último a formação óssea. O entendimento dessas interações irá sem dúvida permitir o uso destas citocinas na engenharia tecidual. O sucesso da engenharia tecidual esquelética irá envolver a utilização das citocinas apropriadas juntamente com uma população de células osteoprogenitoras (KWAN *et al.*, 2007).

A formação, manutenção e a regeneração do ossos são processos complexos que envolvem interações de muitos elementos celulares com reguladores locais e sistêmicos. Esses reguladores incluem fatores de diferenciação e crescimento, hormônios, citocinas e componentes da matriz extracelular, todos com efeitos diretos ou indiretos no osso (YASKO *et al.*, 1992).

Já em uso clínico, as BMPs parecem ser as citocinas mais promissoras na engenharia tecidual esquelética. Estas proteínas, membros da superfamília do fator de crescimento transformador (TGF- β), foram primeiramente isoladas por Urist e colaboradores em 1965 (KWAN *et al.*, 2007). Estes pesquisadores observaram que a matriz óssea desmineralizada induziu a formação de osso e cartilagem quando implantados em locais fora do esqueleto, como o tecido subcutâneo de ratos. Investigações subsequentes indentificaram um componente ativo da matriz como uma proteína e demonstraram que esta poderia ser extraída da matriz óssea. Este componente osteoindutivo foi denominado como BMP (YASKO *et al.*, 1992). Esse grande grupo de proteínas compreende um terço da superfamília do TGF- β (KWAN *et al.*, 2007).

As BMPs 2, 4, 6, 7 e 9 são conhecidas como as mais osteogênicas. Elas regulam a diferenciação em osteoblasto por meio do aumento da transcrição dos genes *Cbfa1/Runx2*, que participam do comissionamento para a linhagem osteoblástica. O efeito das BMPs também demonstrou ser dependente da concentração. Em concentrações baixas, elas induzem quimiotaxia e a proliferação celular. Em concentrações altas, as BMPs induzem a formação óssea (KWAN *et al.*, 2007).

As BMPs possuem importantes funções na formação óssea e na diferenciação de células ósseas, mas as atividades delas não estão restritas a formação óssea e de cartilagem. Elas parecem estar envolvidas em muitos processos morfogênicos durante o desenvolvimento. A BMP-2 e a BMP-4 induzem a formação do mesoderma ventral durante a embriogênese e a diferenciação de células de origem mesodermal (CHEN *et al.*, 1998).

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF-2) é um peptídeo que transmite seus sinais via uma família de quatro tirosina quinases, o que aumenta a proliferação dos osteoblastos e a formação óssea *in vitro* e *in vivo*. Os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) são polipeptídeos de 7,6 kDa que demonstraram estimular a síntese de colágeno ósseo e também a osteogênese e a condrogênese. O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), é um polipeptídeo de 30 kDa, que também demonstrou ser um potente estimulador para a proliferação de osteoblastos, quimiotaxia e também para a síntese de colágeno. A utilização do PDGF *in vivo* também demonstrou aumento da formação óssea após a aplicação deste em osteotomias da tíbia de coelhos e na mandíbula de cães após cirurgia periodontal (KWAN *et al.*, 2007).

Os desafios para a incorporação das citocinas na engenharia tecidual esquelética envolvem a identificação de moléculas nas quais as ações são específicas para a formação óssea. Outras questões incluem o tempo da aplicação, dosagens efetivas e mecanismos de carreamento efetivos (KWAN *et al.*, 2007). Estudos desses fatores de crescimento *in vitro* e em modelos de defeitos ósseos críticos irão ajudar a responder essas perguntas.

3.8 - Estrados

Em pesquisas sobre a célula osteoprogenitora ideal e a identificação de citocinas com potencial para o uso na engenharia tecidual esquelética, avanços na ciência de materiais forneceram uma abundância de inovações no desenvolvimento de um carreador (estrado) apropriado para essas células e moléculas. Um carreador ósseo ideal tem que ser biocompatível, absorvível, osteocondutivo, osteoindutivo, estruturalmente similar ao osso, fácil de usar e de custo acessível. Além disso, os estrados não devem estimular uma resposta imunológica (KWAN *et al.*, 2007). Vários produtos estão sendo comercializados para o tratamento de problemas ortopédicos (GREENWALD *et al.*, 2001). Os produtos variam consideravelmente em composição, estrutura, potencial osteoindutivo e osteocondutivo e os mecanismos envolvidos na absorção e remodelação dos materiais (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

Os materiais utilizados para a produção dos estrados são divididos em três categorias: natural, mineral e polímeros sintéticos.

Estrados naturais incluem o colágeno, ácido hialurônico, alginato de cálcio e a quitosan. Estrados naturais são tipicamente biodegradáveis e em alguns casos, eles exibem a propriedade de osteoindução, exclusiva de células ou citocinas. A desvantagem de estrados naturais é a falta de estabilidade mecânica sendo um fator limitante do uso desses em regiões de apoio do peso no esqueleto. O uso de

estrados naturais em seres humanos também é limitado pelas mudanças biomecânicas que ocorrem com frequência após o processo de esterilização dos materiais (KWAN *et al.*, 2007).

Estrados a base de minerais incluem cerâmicas de cálcio-fosfato e vidro bioativo (KWAN *et al.*, 2007). As cerâmicas de cálcio-fosfato, mais precisamente a hidroxiapatita, é a mais utilizada na prática cirúrgica (SARAHURUDI *et al.*, 2008). Outro exemplo de cerâmica de cálcio-fosfato é o fosfato tricálcio, sendo que a hidroxiapatita mimetiza mais aproximadamente as características estruturais e químicas do componente mineral do osso (KWAN *et al.*, 2007). A hidroxiapatita coralina é um material produzido a partir de corais marinhos. Possui estrutura trabecular (figura 7) natural similar ao osso esponjoso e promove osteocondução (figura 8) (AUER & FACKELMAN, 2000; MILLIS & MARTINEZ, 2003) sendo reabsorvido muito lentamente e em algumas classificações é considerado um material não absorvível (AUER & FACKELMAN, 2000).

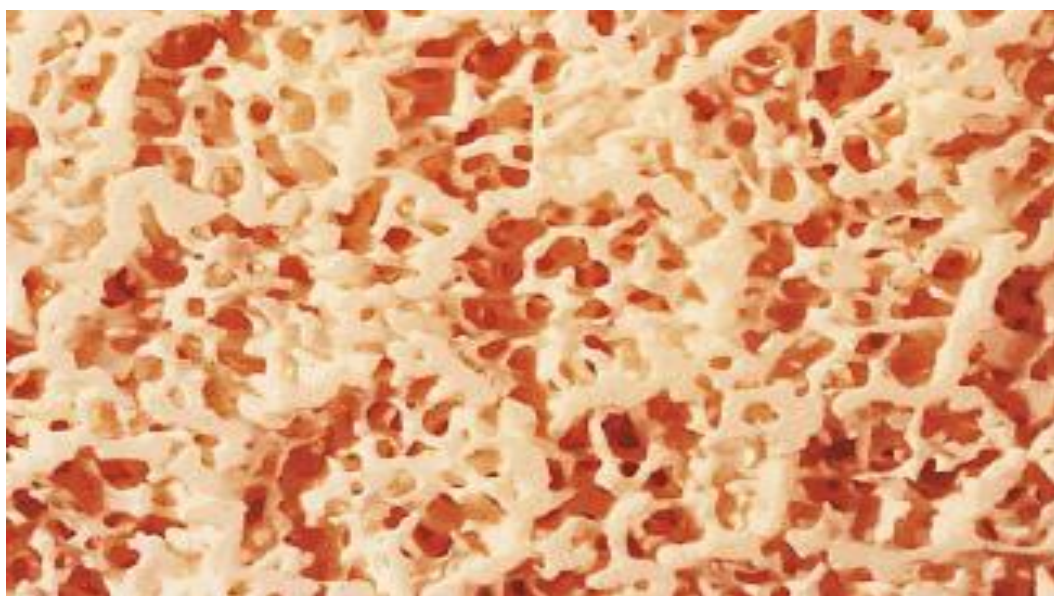


Figura 7 – Estrutura trabecular da hidroxiapatita coralina, semelhante a do osso esponjoso (AUER & FACKELMAN, 2000).

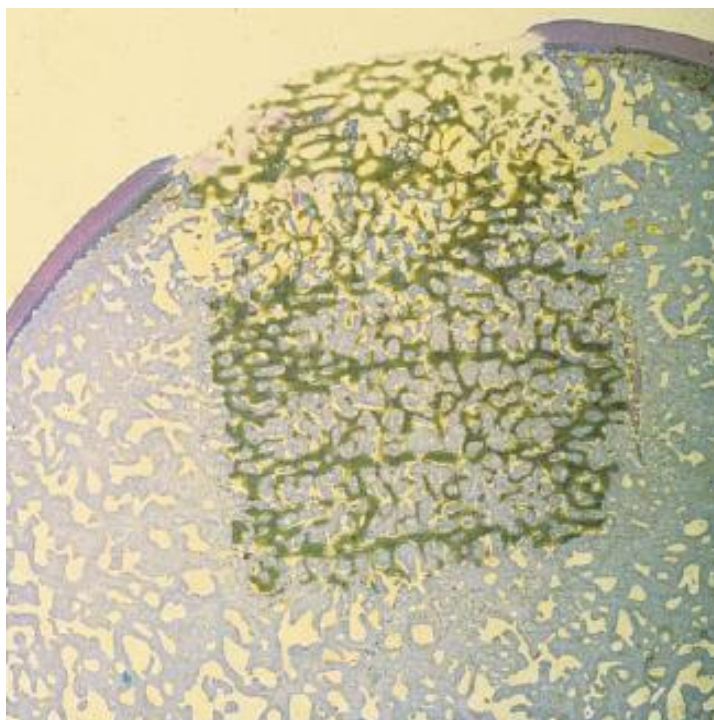


Figura 8– Corte transversal do condilo distal do terceiro osso metacarpiano de um equino adulto, seis meses após a implantação. A parte mais escura demonstra a matriz de hidroxiapatita, que na região em contato com o fluido sinovial não demonstrou formação óssea significativa, enquanto em regiões mais internas está completamente preenchida de osso. (AUER & FACKELMAN, 2000).

Enxerto de osso esponjoso autógeno e matriz óssea desmineralizada podem ter seu efeito osteogênico e osteoindutor aumentado com o uso de hidroxiapatita. Fatores de crescimento adicionados à hidroxiapatita também podem estimular a proliferação óssea (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

Fosfatos tricálcio são substâncias porosas com grande solubilidade e rápida absorção, atuam como osteocondutores e expansores de enxertos (AUER & FACKELMAN, 2000; MILLIS & MARTINEZ, 2003). Essas substâncias fornecem algum tipo de suporte estrutural, previnem a invasão de tecido fibroso enquanto facilitam a substituição por deslizamento (MILLIS & MARTINEZ, 2003). A associação

dos fosfatos com antibióticos ou fatores de crescimento pode ser realizada (figura 9) (AUER & FACKELMAN, 2000; MILLIS & MARTINEZ, 2003).



Figura 9 - O uso de fosfato tricálcio associado a gentamicina é utilizada para tratar infecções ósseas e articulares em eqüinos com sucesso. (AUER & FACKELMAN, 2000).

Estrados a base de polímeros, incluem o ácido polilático, ácido poliglicólico, poliodaxona e policaprolactona, já produzidos para resistir as forças biomecânicas. Essas estruturas são altamente resistentes e são biodegradáveis por meio da hidrólise dos seus componentes. Estrados de polímeros permitem a proliferação de tecido ósseo entremeados em suas estruturas, mas não possuem propriedades osteoindutoras. Estudos atuais estão focados na combinação de formulações de polímeros com hidroxiapatita ou fatores de crescimento, o que iria estimular a diferenciação celular osteogênica (KWAN *et al.*, 2007).

Apesar da maioria dos estrados usados em ortopedia necessitarem de cirurgia aberta para sua aplicação, muitos outros estão sendo estudados, como os

cimentos de cálcio fosfato que possibilitam a aplicação percutânea. Cimentos de cálcio fosfato também possuem alta afinidade de se ligarem a proteínas osteogênicas (EDWARD III *et al.*, 2004).

Os hidrogéis representam outra classe de estrados de polímeros. Eles são formados da polimerização de moléculas como o ácido acrílico e o N-isopropilacrilamida. Os hidrogéis são uma opção atrativa devido as suas propriedades físicas dependentes da temperatura. Eles podem ser desenvolvidos para serem gelatinosos à temperatura ambiente, mas se tornarem mais rígidos à temperatura corporal. Essa propriedade permite que estes materiais produzidos por engenharia tecidual sejam injetados no organismo (KWAN *et al.*, 2007).

4 - CONCLUSÃO

A grande variedade de opções disponíveis para a reconstrução óssea é um indicativo dos muitos avanços feitos com os biomateriais, mas isso também reflete as deficiências de cada método. A engenharia tecidual já está sendo utilizada na prática clínica, por meio de terapia celular e uso de citocinas osteogênicas, especificamente as BMPs, para induzir a formação óssea. As metas a serem alcançadas são o uso de células e citocinas osteogênicas via estrado biologicamente ativo, para que se alcance uma cicatrização de defeito ósseo de maneira mais acelerada.

REFERÊNCIAS

AUER, J.A. & FACKELMAN, G.E. Allogeneic grafts and bone substitutes. In: BRAMLAGE, L.R. ; RICHARDSON, D.W. ; MARKEL, M.D. ; SALIS, B.V. **AO principles of equine osteosynthesis**. Davos, Suíça: AO publishing, cap. 28, p. 333-349, 2000.

ASHTON, B. A. ; ALLEN, T. D. ; HOWLETT, C. R. ; EAGLESOM, C. C. ; HATTORI, A. ; OWEN, M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. **Clinical orthopaedics and related research**, v.151, p. 294–307, 1980.

ARINZEH, T.L. ; PETER, S.J. ; ARCHAMBAULT, M.P. ; den BOS, C. ; GORDON, S. ; KRAUS, K. ; SMITH, A. ; KADIYALA, S. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect. **The Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 85, p. 1927-1935, 2003.

ARNHOLD, S.J. ; GOLETZ, I. ; KLEIN, H. ; STUMPF, G. ; BELUCHE, L.A. ; ROHDE, C. ; ADDICKS, K. ; LITZKE, L.F. Isolation and characterization of bone marrow–derived equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1095-1105, 2007.

BAJADA, S. MAZAKOVA, I. ; RICHARDSON, J.B. ; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2(4), p. 169-183, 2008.

BANFI, A. ; MURAGLIA, A. ; DOZIN, B. ; MASTROGIACOMO, M. ; CANCEDDA, R. ; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 707-715, 2000.

BERNÁ, G. ; QUINTO-LEÓN, T. ; ENSEÑAT-WASER, R. ; MONTANYA, E. ; MARTÍN, F. ; SORIA, B. Stem cells and diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 55, p. 206-212, 2001.

BIANCO, P. ; ROBEY, P. G. Skeletal stem cells. In: Lanza, R.P. **Handbook of Adult and Fetal Stem Cells**. EUA: Academic Press, San Diego, CA, p. 415–424. 2004.

BODDE, E.W.H. ; SPAUWEN, P.H.M. ; MIKOS, A.G. ; JANSEN, J.A. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 85A, p. 206–217, 2008.

BRUDER, P.S ; KURTH, A.A ; SHEA, M. ; HAYES, C.W.; JAISWAL, N.; KADIYALA,S. Bone Regeneration by Implantation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopedic Research**, v. 16, n.2, p. 155-162 , 1998.

BUTTERY, L.D. ; BOURNE, S. XYNOS, J.D. ; WOOD, H. ; HUGHES, F.J. ; HUGHES, S.P. ; EPISKOPOU, V. ; POLAK, J.M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 89-99, 2001.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E.D.; THOMSON, J.; WEST, M. **Essentials of Stem Cell Biology**. 1. ed. Elsevier Academic Press, p. 205-210, 2006.

CHEN, D. ; JI, X. ; HARRIS, M.A. ; FENG, J.Q. ;KARSENTY, G. ; CELESTE, A.J. ; ROSEN, V. ; MUNDY, G.R. ; HARRIS, S.E. Differential Roles for Bone Morphogenetic Protein (BMP) Receptor Type IB and IA in Differentiation and Specification of Mesenchymal Precursor Cells to Osteoblast and Adipocyte Lineages. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, p.295-305, 1998.

COWAN, C.M. ; SOO, C. ; TING, K. ; WU, B. Evolving concepts in bone tissue engineering. **Current topics in developmental biology**, v.66, p. 239-285, 2005.

CRIGLER L., KAZHANIE A., YOON T. J., ZAKHARI J., ANDERS J., TAYLOR B., VIRADOR V. M.; Isolation of a mesenchymal cell population from murine dermis that contains progenitors of multiple cell lineages. **FASEB Journal**, 2050 – 2063, 2007.

EDWARDS III, R.B. ; SEEHERMAN, H.J. ; BOGDANSKE, J.J. ; DEVITT, J. ; VANDERBY JR., R. ; MARKEL, M.D. Percutaneous Injection of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in a Calcium Phosphate Paste Accelerates Healing of a Canine Tibial Osteotomy **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 86, p.1425-1438, 2004.

FACKELMAN, G.E. & AUER, J.A. Bone graft biology and autogenous grafting. In: BRAMLAGE, L.R. ; RICHARDSON, D.W. ; MARKEL, M.D. ; SALIS, B.V. **AO principles of equine osteosynthesis**. Davos, Suíça: AO publishing, cap. 27, p. 323-331, 2000.

FRIEDENSTEIN, A.J. ; CHAILAKHJAN, R.K. ; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and tissue kinetics**, v. 3, p. 393–403, 1970.

FRIEDENSTEIN, A. J. ; PETRAKOVA, K. V. ; KUROLESOVA, A. I. ; FROLOVA, G. P. Heterotopic transplants of bone marrow: Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues, **Transplantation**, v. 6, p. 230–247, 1968.

FRIEDENSTEIN, A. J. ; PIATETZKY-SHAPIO, I. I. ; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, v.16, 381–390, 1966.

GREENWALD, A.S. ; DPHIL ; BODEN, S.D. ; GOLDBERG, V.M. ; KHAN, Y. ; LAURENCIN, C.T. ; ROSIER, R.N. Bone-graft substitutes: Facts, fictions, and applications. **Journal of bone and joint surgery**, v. 83-A, sup. 2, parte 2, p. 98-103, 2001.

GRITTI, A. ; VESCOLI, A.L. ; GALLI,R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **Journal of physiology Paris**, v. 96(1-2), p.81-89, 2002.

JAISWAL, N. ; HAYNESWORTH, S.E. ; CAPLAN, A.I. ; BRUDER, S. P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p. 295–312, 1997.

JOHNSON, A.L. & DUNNING, D. **Atlas of orthopedic surgical procedures of the dog and cat**. St. Louis, EUA: Elsevier Science Copyright, parte 2, cap. 48, p.134-135, 2005.

JOHNSON, A.L. . Bone grafts. In: FOSSUM, T.W. **Small animal surgery**. St. Louis, EUA: Mosby, parte 3, cap. 31, p. 962-967, 2007

KOGLER G., SENSKEN S., AIREY J. A., TRAPP T. MÜSCHEN M., FELDHAHN N., LIEDTKE S., SORG R. V., FISCHER J., ROSEBAUM C., GRESCHAT S., KNIPPER A., BENDER J., DEGISTIRICI O., GAO J., CAPLAN A. L., COLLETTI E. J., ALMEIDA P. G., MÜLLER H. W., ZANJANI E., WERNET P.; A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **The Journal of Experimental Medicine**, 200: 123 – 135, 2004.

KREBSBACH, P. H. ; KUZNETSOV, S. A. ; SATOMURA, K. ; EMMONS, R. V. ; ROWE, D. W. ; ROBEY, P. G. Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. **Transplantation**, v. 63, p.1059–1069, 1997.

KWAN, D.M. ; WAN, D.C. ;LONGAKER, M.T. Skeletal-Tissue Engineering. In: LANZA, R. ; LANGER,R. ; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**, 3 ed. , San Diego, Elsevier Academic Press, cap. 62, p. 935-944, 2003.

LANGER, R.; VACANTI, J.P. Tissue engineering. **Science**, v. 260, p. 920-926,1993.
LEE O, K., KUO t. K., CHEN, W. M., LEE K. D., HSIEH S. L., CHEN, T. H.. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood Journal**, v. 103, p. 1669 – 1675, 2003.

LEVITT, L. ; FOWLER, J.D. ; LONGLEY, M. ; BOWEN, V. ; WILKINSON, A.A. - A developmental model for free vascularized bone transfers in the dog. **Veterinary surgery**, vol.17, No 4, p. 194-202, 1988.

MAJORS, A.K. ; BOEHM, C.A. ; NITTO, H. ; MIDURA, R.J. ; MUSCHLER, G.F. Characterization of Human Bone Marrow Stromal Cells with Respect to Osteoblastic Differentiation. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 546-557, 1997.

MARTIN, D.R. ; COX, N.R. ; HATHCOCK, T.L. ; NIEMEYER, G.P. ; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 879–886, 2002.

MILLIS, D.L. & MARTINEZ, A.S. Bone grafts. In: SLATER, D. **Textbook of small animal surgery**. Filadélfia, EUA: Elsevier Science Copyright, 2003, volume 2, seção 15, cap. 133, p. 1875-1890.

MURAGLIA, A., ZANCEDDA, R., QUOTTO, R.; Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, v. 113: 1161 – 1166, 2000.

NÖTH, U., OSYCZKA A. M., TULI, R., HICKOK, N. J.; DANIELSON, K. G., TUAN R. S.; Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular bone-derived cells. **Journal of Orthopedic Research**., 20: 1060-1069, 2002.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THONSON, J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines. **Stem Cells**, v. 19, p.193-204, 2001.

OHGUSHI, H. ; GOLDBERG, V. M. ; CAPLAN, A. I. ; Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. **Acta orthopaedica Scandinavica**, v. 60, p. 334-339, 1989.

OWEN, M. ; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation symposium**, v. 136, p. 42–60, 1988.

PIERMATTEI, D.L. ; FLO, G.L. ; DeCAMP, C.E. ; **Handbook of small animal orthopedics and fracture repair**. St. Louis, EUA: Elsevier Science Copyright, parte 1, cap. 3, p. 160-167, 2006.

PLANAT – BÉRNARD V., MENARD C., ANDRÉ, M., PUCEAT, M., PEREZ, A., GARCIA - VERDUGO, J.M., PÉNICAUD, L., CASTEILLA L.; Spontaneous cardiomoyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells. **Circulation research**, v. 94, p. 223 – 229, 2004.

REMEDIOS, A. Bone and Bone Healing. In: MARTINEZ, S.A. **The Veterinary Clinics Of North America – Fracture Management and Bone Healing**, v. 29, n. 5, p. 1029-1044, 1999.

SABATINI F., PETECCHIA L., TAVIAN M., Jodon de Villeroché V., ROSSI G. A., Brouty – Boyé D. Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities. **Laboratory investigation**, v. 85, p. 962 – 971, 2005.

SALGADO, A.J. ; COUTINHO, O.P ; REIS, R.L. Bone-tissue engineering: state of the art and future trends. **Macromolecular bioscience**, v. 4, p. 743-765, 2004.

SARAH RUDI, K. ; MOUSAVI, M. ; GROSSSCHMIDT, K. ; SELA, N. ; KÖNIG, F. ; VÉCSEI, V. ; AHARINEJAD, S. Combination of Anorganic Bovine-Derived Hydroxyapatite with Binding Peptide Does Not Enhance Bone Healing in a Critical-Size Defect in a Rabbit Model. **Journal of Orthopaedic Research**, DOI 10.1002/jor.20527, p. 1-8, 2007.

SHI S., BARTOLD P. M., MIURA M., SEO B. M., ROBEY P. G., GRONTHOS S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. **Orthodontic craniofacial research**. 8: 191 – 199, 2005.

SZENTIMREY, D. ; FOWLER, D. ; JOHNSTON, G. ; WILKINSON, A. Transplantation of the canine distal ulna as a free vascularized bone graft. **Veterinary surgery**, v. 24, p.215-225, 1995.

UGARTI, D. A, MAIZONO, K, ELBANY A., ALFONSO Z., ZEYK, V. A., ZHU, H., DIAGOO, I. I., ASHJIAN, P., THOMAS, B., BEHNHAIM, V., CHEN, I., FRASER, I., HIDRICK, N. H.; Comparison of multi – lineage cells from human tissue and bone marrow. **Cells Tissue Organs**, v.174: 101 – 109, 2003.

WHATT, F.M.; HOGAN, B.L.M. Out of the Éden: stem cells and their niches. **Science**, v. 278, p.1427-1430, 2000.

VACANTI, C.A. The history of tissue engineering. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. 569-576, 2006.

VACANTI, J.P. Beyond transplantation, the third annual Samuel Jason Mixter Lecture. **Archives in Surgery**, 123: 543-549, 1988.

VACANTI, J.; VACANTI, C.A. The history and Scope of Tissue Engineering. In: Lanza, R.; Langer, R.; Vacanti, J. **Principles of tissue engineering**, 3 ed. Elsevier Academic Press, p. 3-6, 2007.

VOGEL, G. Can old cells learn new tricks. **Science**, v. 278, p. 1418-1419, 2000.

VOLK, S.W. ; DIEFENDERFER, D.L. ; CHRISTOPHER, S.A. ; HASKINS, M.E. ; LEBOY, P.S. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1729-1737, 2005.

YASKO, A.W. ; LANE, J.M. ; FELLINGER, E.J. ; ROSEN, V. ; WOZNEY, J.; WANG, E.A. The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. **The Journal of bone and joint surgery. American volume**, v. 74, p. 659-670, 1992.

YOUNGER, E. & CHAPMAN, M.W. Morbidity at bone graft donor sites. **Journal of Orthopaedic Trauma**, v. 3, p.192-195,1989.

ZHANG, J.F. ; LI, G. ; MENG,C.L. ; DONG, Q. ; CHAN, C.Y. ; He, M.L. ; LEUNG, P.C, ZHANG, Y.O. ; KUNG, H.F. Total flavonoids of Herba Epimedii improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells. **Phytomedicine**, v.16, p. 521–529, 2009.

ZUK P. A., ZHU M., ASHIJIAN P., DE UGARD D. A., HUANG J. I., MISUNO H., ALFONSO Z.C., FRASER J. K., BENHAIM P., HEDRIK M. H., Human adipose thissue is a source of multipotent stem cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p.4279 – 4295, 2002.

CAPÍTULO I

ISOLAMENTO, CULTIVO E CARACTERIZAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA E DO TECIDO ADIPOSE DE GATO

ISOLATION, CULTURE AND CHARACTERIZATION OF MESENCHYMAL STEM CELLS FROM BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE OF CAT

RESUMO - As células tronco são componentes fundamentais da engenharia tecidual, sendo as células-tronco multipotentes muito promissoras. Células tronco mesenquimais (CTMs) possuem capacidade de diferenciação mais limitada que as células tronco embrionárias mas apresentam grandes vantagens, como fácil isolamento, sua capacidade de propagação em cultura e de não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alógenos. De acordo com *International Society for Cellular Therapy* (ISCT), existe três requerimentos mínimos para uma população de células serem classificadas como CTMs. Um deles é que elas devem ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Outra característica é sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico. O outro requerimento é a expressão de marcadores CD 105, CD 73 e CD 90 e ausência de CD 34, CD 45, CD 14 ou CD 11b, CD 79, ou CD 19 e HLA-DR em mais de 95% das células em cultura. No presente trabalho foram isoladas CTMs da medula óssea (MO) e do tecido adiposo (TA) de gatos. As células se diferenciaram em osteoblastos, condrócitos e adipócitos usando-se meios de cultivo apropriados. Neste estudo foram utilizados anticorpos para caracterização imunofenotípica para humanos, os quais apresentaram reações cruzadas com as CTMs de gatos. As CTMs da MO marcaram positivamente para CD 105 e CD 29 e fracamente para CD34. As células do tecido adiposo marcaram, ainda que

discretamente, para CD 105 e negativamente para CD 45 e CD 34. Uma amostra teve marcação discreta para CD 29 (9,57%). As avaliações de morfologia celular e de morfometria das CTMs isoladas de MO e TA de gato foram realizadas para a caracterização das células. Nos cultivos de CTMs obtidas de MO e TA verificou-se o predomínio de duas formas, as fusiformes e as pavimentosas com citoplasma abundante. Em relação aos ensaios de CFU-F foi observado maior número de colônias nas amostras obtidas do TA, o que sugere que estas células tenham um potencial de expansão melhor que as células da MO em felinos. Portanto este estudo possibilitou a caracterização das células tronco mesenquimais isoladas da MO e do TA de gatos.

ABSTRACT - The stem cells are key components of tissue engineering, and the multipotent stem cells the most promising. Mesenchymal stem cells (MSCs) have the capacity to differentiate more limited than embryonic stem cells but have important advantages such as easier isolation, its ability to spread in culture and are not immunogenic and can theoretically be used in allogenic transplantation. According to the International Society for Cellular Therapy (ISCT), there are three minimum requirements for a cell classification as MSCs. One of them, is that these cells should be able to differentiate into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes. Another characteristic is that they must be isolated from a population of mononuclear cells based on their selective adherence, in culture, to the surface of the plastic. These cells express CD 105, CD 73 and CD 90 and have no expression of CD 34, CD 45, CD 14 and CD 11b, CD 79 or CD 19 and HLA-

DR in over 95% cells in culture. In the present study we isolated MSCs from bone marrow (BM) and adipose tissue (AT) of cats. These cells differentiated into osteoblasts, chondrocytes and adipocytes using appropriate culture medium. In this study we used antibodies against human cells for immunophenotyping characterization, which showed cross-reactivity with MSCs cat. MO samples scored positive for CD 105 and CD 29 and weakly for CD34. The cells of adipose tissue marked, although slightly, to CD105 and were negative for CD45 and CD34. One sample had a slight markup for CD29 (9.57%). Evaluations of cell morphology and morphometry of MSCs isolated from TA and MO cat were performed to characterize the cells. In cultures of MSCs obtained from BM and TA there was a predominance of two forms, the spindle shaped and the flatted cells with abundant cytoplasm. For CFU-F assays, we observed a higher number of colonies in adipose tissue samples compared with bone marrow samples. This suggests that adipose derived stem cells have a better potential for expansion in cats. The study demonstrated the plasticity of MSCs isolated from BM and TA cats.

1 – INTRODUÇÃO

O termo células tronco, do inglês *stem cell*, diz respeito a células precursoras que possuem a capacidade de diferenciação e auto renovação ilimitadas, podendo originar uma variedade de tipos teciduais tais como osso, tecido adiposo, muscular, neuronal, entre outros (WATT & HOGAN, 2000; BERNÁ, 2001; ODORICO et al., 2001; GRITTI et al., 2002). Desta forma acredita-se que as células tronco presentes nos diferentes tecidos tenham papel regenerativo quando estes sofrem uma lesão ou injúria (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

As células tronco presentes no embrião são designadas células-tronco embrionárias, mas podem também ser encontradas em tecidos adultos, denominadas de células-tronco adultas (VOGEL, 2000). As células tronco aparecem como a opção mais promissora para a medicina regenerativa. A habilidade das células-tronco embrionárias em se diferenciar em osteoblastos e osso foi demonstrado *in vitro* com células embrionárias de murinos, na presença da dexametasona (BUTTERY *et al.*, 2001). Entretanto, devido a controvérsias políticas e éticas que cercam o uso destas células, os pesquisadores focaram suas atenções nas fontes de células tronco multipotentes pós-natais (KWAN *et al.*, 2007).

Poucos anos após a descoberta das células tronco hematopoiéticas, na década de 60, os estudos de Friedestein e colaboradores e mais tarde de Owen e Friedestein, revelaram a existência de progenitores multipotentes, na medula óssea pós-natal, com grande potencial para dar origem à múltiplos e distintos tecidos mesodermiais (FRIEDESTEIN *et al.*, 1966 ; OWEN & FRIEDESTEIN, 1988). A partir dessas descobertas, reconheceu-se a existência de dois sistemas distintos na medula óssea – o sistema hematopoiético e o sistema estromal, este último sendo o precursor das linhagens osteogênica, condrogênica, adipocítica, fibroblástica e de suporte estromal a partir de um progenitor comum (BIANCO & ROBEY, 2004).

De 1968 a 1972, o laboratório do Doutor Arnold Caplan em Cleveland, Estados Unidos, desenvolveu e refinou métodos para o isolamento e cultura de células mesenquimais indiferenciadas, originadas das células germinativas de embriões de frango de quatro a cinco dias de idade. Essas células se multiplicavam em cultura e dependendo das condições do cultivo e da densidade inicial no plaqueamento, elas se diferenciavam em músculo, cartilagem, osso e vários outros tecidos conectivos (CAPLAN, 2006).

Células tronco mesenquimais possuem capacidade de diferenciação mais limitada que as células tronco embrionárias mas apresentam grandes vantagens, levando-se em conta o fácil isolamento destas células, sua capacidade de propagação em cultura e por não serem imunogênicas, podendo ser teoricamente empregadas em transplantes alógenos (BYDLOWSKI *et al.*, 2009).

A natureza estromal das células tronco mesenquimais pode ser caracterizada pela rápida aderência dessas células após o plaqueamento da medula óssea em baixa densidade celular. Essas células aderentes, chamadas de CFU-F (*colony forming unit – fibroblasts*) proliferam e estabelecem colônias. Após a expansão *ex vivo*, elas teriam a capacidade de gerar osso e cavidade medular quando transplantadas para um sistema *in vivo* aberto (KREBSBACH *et al.*, 1997) e cartilagem, osso, tecido fibroso e gordura quando transplantadas para um sistema *in vivo* fechado (ASHTON *et al.*, 1980; FRIEDESTINE *et al.*, 1970).

As CTMs e células semelhantes às CTMs foram identificadas em vários outros tecidos, além da medula óssea e sangue, tanto no indivíduo adulto (músculo esquelético, tecido adiposo, tecido sinovial, tendões, pele – incluindo a derme – trabéculas ósseas, periósteo, dente decidual e cartilagem articular) (BAJADA *et al.*, 2008; BYDLOWSKI, 2009), como no feto (líquido amniótico, placenta, fígado, baço, timo, pulmão). De fato foi sugerido que células com características de células tronco mesenquimais existem em virtualmente todos os órgãos e tecidos pós natais (MEIRELLES *et al.*, 2008)

A aplicação das células tronco mesenquimais em cultura, após a sua expansão e muitas vezes associadas a um carreador, é capaz de regenerar segmentos de ossos perdidos após trauma ou doença focal (BIANCO & ROBEY,

2001; BIANCO & ROBEY, 2004). Modelos animais e testes clínicos em seres humanos têm mostrado total eficácia terapêutica (QUARTO et al., 2001).

Apesar da atratividade das células tronco mesenquimais para o uso na engenharia tecidual, existe um fator limitante que é a baixa frequência dessas células no estroma da medula óssea. Nas análises de aspirados de medula óssea de seres humanos verificou-se que a incidência das células-tronco mesenquimais (CTMs) pode ser menor que 1/27000 células (BANFI *et al.*, 2000). Além disso o procedimento para a obtenção da medula óssea é doloroso, necessitando de anestesia local ou geral (KWAN *et al.*, 2007).

Em 2001 ZUK *et al.* (2001), descreveram a diferenciação de células tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo de seres humanos. As células-tronco mesenquimais derivadas desta fonte são especialmente atrativas devido a sua fácil obtenção, a grande quantidade que pode ser obtida em uma coleta e sua rápida expansão.

As células tronco obtidas da medula óssea ou do tecido adiposo são uma população heterogênea de células (MURAGLIA et al., 2000). Diversos fatores, como métodos de isolamento, tipo de superfície de cultura, meio de cultura, densidade de semeadura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos, afetam não somente a expansão e as propriedades imunogênicas das CTMs, mas também a diferenciação. Idade do doador de células, ou a presença de doenças também podem influenciar (BYDLOWSKI, 2009).

Na medicina veterinária as pesquisas com células tronco estão sendo realizadas o que possibilitou a terapia celular também seja uma realidade nos animais. Os estudos ainda são escassos e com ênfase principalmente na medicina. Até o presente momento existe apenas um relato de isolamento de células tronco de medula

óssea de gato (MARTIN *et al.*, 2002) e não há relatos de isolamento de CTMs do tecido adiposo destes animais.

Os objetivos desse trabalho foram o isolamento, cultivo e diferenciação de células tronco do tecido adiposo e de medula óssea de gatos e a caracterização morfológica e morfométrica das células.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

No período de janeiro a dezembro de 2009 foram coletadas 14 amostras de medula óssea de gatos com fratura e que foram submetidos a procedimentos cirúrgicos de osteossíntese. No mesmo período cinco amostras de tecido adiposo (TA) foram coletados de gatas submetidas a procedimentos de ováriosalpingohisterectomia (OSH). As amostras da medula óssea e do tecido adiposo foram obtidas de animais domiciliados atendidos no Hospital Veterinário da UFPR e em clínicas veterinárias da cidade de Curitiba. As amostras de MO foram obtidas de animais com idades entre nove meses e dez anos, sendo oito machos e sete fêmeas e não apresentavam sinais de doenças concomitantes ao quadro de fratura. As amostras de TA foram coletadas de cinco fêmeas com idade entre cinco meses e oito anos. Os perfis hematológicos e bioquímicos renal e hepático foram realizados previamente para a avaliação anestésica. Não foram verificadas alterações nos exames que impedissem a cirurgia nos 19 animais. Os dados dos animais foram registrados em fichas individuais.

2.2 AMOSTRAS

2.2.1 MEDULA ÓSSEA

As regiões do trocanter maior do fêmur e do tubérculo maior do úmero, contralaterais à lesão óssea preexistente, foram preparadas para procedimento cirúrgico asséptico. Com os animais sob anestesia geral, através da infusão intravenosa de propofol (6 mg/kg), uma incisão de pele foi feita sobre o trocanter maior do fêmur ou sobre o tubérculo maior do úmero de cada paciente. A agulha de Jamishidi de punção de MO, *gauge* 13 e catéteres calibre 14 foram inseridos na córtex do osso até alcançar a região metafisária. Uma seringa, contendo 10.000 UI de heparina foi acoplada a agulha ou aos catéteres, e procedeu-se o aspirado da medula óssea. Foram coletados em média 4,1 mL de MO.

2.2.2 TECIDO ADIPOSEO

As regiões abdominais das gatas foram preparadas para procedimento cirúrgico asséptico. Com os animais sob anestesia geral, através da infusão intravenosa de propofol (6mg/kg), uma incisão de pele de aproximadamente quatro centímetros foi feita caudal a cicatriz umbilical de cada paciente. A amostra de tecido adiposo subcutânea era coletada por dissecação cirúrgica e acondicionada em tubo cônico estéril de 50 mL (TPP, Trasadingen, Switzerland). Coletou-se em média 4,6 g de tecido adiposo.

2.3 ISOLAMENTO DE CÉLULAS MONONUCLEARES E CULTURA DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS

2.3.1 MEDULA ÓSSEA

Para isolamento das células mononucleares da medula óssea, entre as quais estão as células tronco mesenquimais, o aspirado de MO foi diluído na proporção de 1:3 com meio de Dulbecco modificado por Eagle (DMEM) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e após colocado gentilmente em tubo cônico de 50 mL (TPP, Trasadingen, Switzerland) contendo 10 mL de um gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (1,077

g/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, USA). O material foi centrifugado a 1500 rpm, durante 30 minutos, com aceleração mínima e sem freio. Após a retirada do sobrenadante, composto por plasma e meio de cultivo, o anel de células mononucleares foi removido com auxílio de pipeta graduada e diluída em meio de cultura para a lavagem das células (Figura 1). Foram realizadas mais duas centrifugações a 1500 rpm, durante 10 minutos para lavar o *pellet* de células. Após este procedimento as células foram ressuspensas em 5 mL de meio DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e 1% de penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) para a contagem e viabilidade celular em câmara de Neubauer. As células mononucleares foram plaqueadas em frascos de cultivo de 75 cm² (TPP, Trasadingen, Switzerland), na densidade de 1×10^6 células por mL de meio, em um total de 10×10^6 células por frasco. O meio comercial para cultivo de células mesenquimais MSCBM (Cambrex Bio Science, MD, USA) também foi utilizado para o cultivo de algumas amostras. Os frascos foram mantidos em estufa com 5% CO₂, a 37° C e 95% de umidade. O meio de cultivo foi trocado 48 horas após o plaqueamento inicial para a remoção de células não aderentes ao frasco de cultivo, ou seja as células da linhagem hematopoética ou mortas. Posteriormente para manutenção do cultivo, o meio foi trocado duas vezes por semana.

As culturas celulares foram subcultivadas quando alcançavam 80 a 90% de confluência. As células foram dissociadas dos frascos utilizando 0,25% tripsina/EDTA (Invitrogen™, NY, USA) e repicadas para outros frascos de cultivo (passagem, P1).

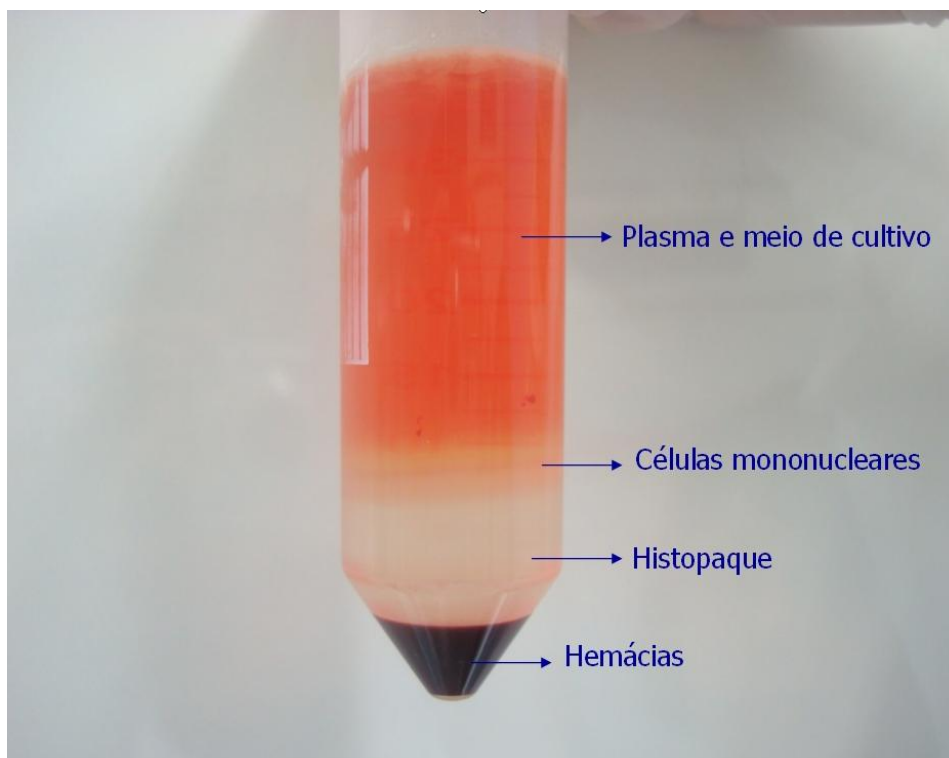


Figura 1: Isolamento de células mononucleares da medula óssea por gradiente de densidade.

2.3.2 TECIDO ADIPOSEO

As células tronco derivadas do tecido adiposo foram isoladas pelo método de digestão enzimática (44). Em média 4,6 g de tecido adiposo foram lavados com PBS (Gibco™ Invitrogen, NY, USA). O material foi macerado com auxílio de bisturi, pesado e realizada a digestão enzimática com 1 mg/mL de collagenase tipo I (Invitrogen™, NY, USA) em estufa a 37°C, com agitação constante durante 30 minutos. O material foi lavado com PBS e filtrado com filtros de porosidade de 100 e 40 µm (BD FALCON™, BD Biosciences Discovery Labware, Bedford, USA). As células foram lavadas novamente e os eritrócitos presentes foram removidos pela adição de um tampão de lise, pH 7,3. Após a última lavagem com PBS, para remover o tampão de lise, as células foram contadas e verificada a viabilidade celular em camara de Neubaurer. As células foram plaqueadas em uma densidade de 2×10^5 células/cm² em frascos de 25 cm² em meio DMEM-F12 (Gibco™

Invitrogen, NY, USA) suplementado com 10% de SBF, penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). O meio foi trocado 48 horas após o plaqueamento inicial e após este período, duas vezes por semana.

2.4 CONTAGEM DE CÉLULAS E VIABILIDADE CELULAR

Antes do plaqueamento inicial e a cada passagem foi feita a contagem e verificada a viabilidade celular com azul de Tripán 0,4 % (Sigma Chemical, St. Louis, USA) em solução salina utilizando a câmara de Neubauer. Em uma placa de 96 poços, foi preparada uma mistura com 50 µl da suspensão celular e 10 µl da solução de azul de Tripán 0,4%. Após cinco minutos este material foi colocado na câmara de Neubauer e contadas as células nos 25 quadrantes centrais. As células viáveis ficam mais refringentes e as não viáveis, coradas em azul. A porcentagem de células viáveis foi determinada pelo seguinte cálculo:

Número total de células – 100%

Número de células vivas – X

2.5 MORFOLOGIA CELULAR

Para a realização do estudo de morfologia celular 5.000 células num volume de aproximadamente 20-30 µL de meio de cultivo foram plaqueadas sobre as lâminulas de vidro em placas de cultivo de 40 x 11 mm (TPP, Trasadingen, Switzerland) e mantidas em estufa a 37°C e com 5% de CO₂ durante uma hora para a aderência celular. Após este período foi adicionado 2 mL de meio em cada placa, as quais foram mantidas em cultivo durante 24, 48, 72 e 120 horas (Figura 2).

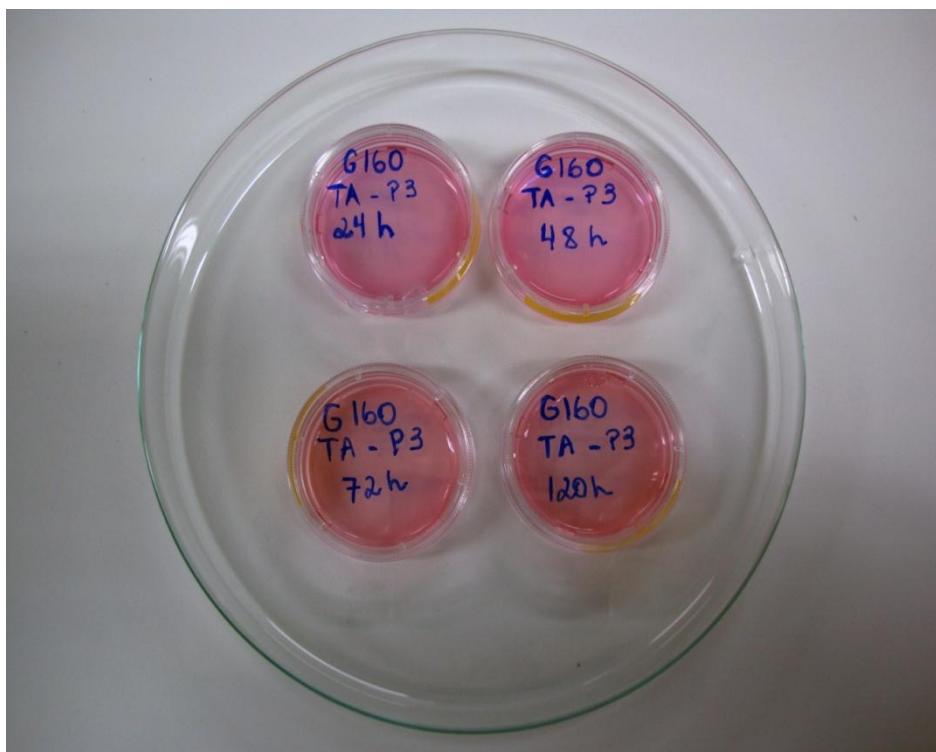


Figura 2: Placas de cultivo com células tronco mesenquimais isoladas de tecido adiposo de gato para estudo morfológico.

Nos períodos indicados, o meio de cultura foi retirado da placa até a secagem das lamínulas contendo as células. Foram adicionadas 20 gotas de corante *Wright* (Laborclin, Pinhais, PR), foram aguardados cinco minutos e posteriormente acrescentado 20 gotas de água destilada. Após 15 minutos as lamínulas foram lavadas com água destilada e deixadas secando a temperatura ambiente. Depois de secas as lamínulas foram montadas com Entelan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) sobre laminas de vidro.

Cinquenta células de cada período foram avaliadas quanto a morfologia e mensuradas. As medições das células foram feitas usando o programa *Motic Image Plus2.0®* (Pequim, China).

2.6 DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIS

Para a diferenciação das CTMs nas três linhagens, adipócitos, osteoblastos e condrócitos, 20.000-30.000 células entre P3-P4 foram plaqueadas em triplicatas

sobre lamínulas de vidro em placas de 24 poços (TPP, Trasadingen, Switzerland)..Ao atingir 80% de confluência da cultura celular foram adicionados os meios com ou sem indutores.

2.6.1 DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA

Para indução da diferenciação adipogênica foram utilizados dois meios comerciais (Cambrex Bio Science, MD, USA), o de manutenção e de indução. Trocas cíclicas entre os dois meios foram feitas durante um período de 14-21 dias.

Após o período de diferenciação as células foram fixadas com Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) durante 8 minutos, lavadas 2 vezes com etanol 70% e água Miliq e coradas com *Oil Red O* (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) por uma hora, o qual cora os vacúolos lipídicos. O corante hematoxilina-eosina (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) foi utilizado para corar os núcleos. Para a montagem das laminas foi utilizado glicerol.

As células controle foram cultivadas durante o mesmo período, porém com meio sem adição de indutores.

2.6.2 DIFERENCIAÇÃO OSTEOGÊNICA

O meio para a diferenciação osteogênica foi composto de 0,1 $\mu\text{mol/L}$ dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 10 mmol/L β -glicerolfosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 50 $\mu\text{mol/L}$ de ascorbato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) diluídos em DMEM contendo 15% SBF. O meio foi trocado a cada três dias durante um período de 14-21 dias. As células controle foram mantidas durante o mesmo período com meio suplementado com 15% de SBF.

As células foram fixadas com Bouin (Biotec, Labmaster, Paraná, Brazil) e lavadas duas vezes com etanol 70% e com água MilliQ. O material foi incubado durante 15 minutos com Alizarina S com pH 7,0 e pH 4,2 (Fluka Chemie, Buchs, UK) a temperatura ambiente para avaliar o acúmulo de cálcio. Após esse período o corante foi removido e adicionado *Light green* (Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) por dois minutos para contra-coloração das células.

Antes da montagem das lâminas, as células foram lavadas duas vezes com água MilliQ e com auxílio de uma pinça as lamínulas foram retiradas e passadas por uma bateria de acetona e xilol em diversas concentrações. As lamínulas foram montadas sobre uma lâmina de vidro utilizando Entelan (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

2.6.3 DIFERENCIAÇÃO CONDROGÊNICA

Para a indução da diferenciação condrogênica foi feita a cultura em micromassa. Após a tripsinização cerca de 200.000-400.000 células foram ressuspensas em meio de cultura e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 500 µL de meio controle ou de indução de diferenciação. Foram utilizados dois meios diferentes para avaliar a diferenciação condrogênica: meio 1 – DMEM suplementado com 15% de soro bovino fetal contendo 0,01 µmol/L de dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 397 µg/mL de ácido ascórbico-2-fosfato (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 1 mmol/L de piruvato de sódio (Gibco™ Invitrogen, NY, USA), 10 ng/mL de fator de crescimento transformador β (TGF- β 1) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 1% insulín-transferrina-selênio-X (Gibco™ Invitrogen, NY, USA) e o meio 2 - Meio de diferenciação condrogênica comercial (Cambrex Bio Science, MD, USA). Os *pellets* celulares foram mantidos em estufa com 5% de CO₂, o meio foi

trocado a cada três dias e o tempo de cultura foi de 21 dias. Após este período as células foram fixadas com formalina 10% e desidratadas com várias diluições de etanol e colocadas em blocos de parafina. Cortes de 4 µm de espessura foram corados com azul de toluidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para visualização da matriz de mucopolissacarídeos.

2.7 DETERMINAÇÃO DOS ANTÍGENOS DE SUPERFÍCIE

Para a determinação do perfil de antígenos de superfície, foram utilizados marcadores de superfície para algumas proteínas humanas, as quais são utilizadas para caracterizar as células tronco mesenquimais: CD105 puro; CD44 e CD31 conjugados com fluoresceína isotiocianato (FITC); CD73, CD166 e CD34 conjugados com ficoeritrina (PE); CD29 conjugado com alofococianina (APC) e CD45 conjugado com proteína clorofila peridinina (PerCP), todos da BD Pharmingen (CA, USA). Após a dissociação das células com tripsina-EDTA, foram colocadas cerca de 400.000 células por tubo, as quais foram lavadas com PBS e incubadas com os anticorpos específicos durante 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. Após este período as células foram novamente lavadas com PBS e fixadas com PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Para o marcador CD105, o qual não era conjugado com um fluorocromo, após a incubação de 30 minutos, as células foram lavadas com PBS e incubadas durante 15 minutos com o anticorpo secundário IgG cabra anti-camundongo (Caltag laboratories, Burlingame, CA). Como controles foram utilizadas células incubadas com os anticorpos isotípicos conjugados com FITC, PE, PerCP e APC (BD Biosciences Pharmingen). Cerca de 10.000 células foram adquiridas, a avaliação foi feita utilizando o equipamento FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e os dados foram analisados pelo *software* FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA).

2.8 ENSAIO CLONOGÊNICO E CONTAGEM DE UFC-F

Para avaliação do número de progenitores mesenquimais foram feitos ensaios para identificação das Unidades Formadoras de Colônia Fibroblastóides (UFC-Fs). A cada passagem, após serem tripsinizadas, as células foram plaqueadas em duplicatas em placas de petri com 9,6 cm² de área. Foram utilizadas duas concentrações celulares diferentes: 470 e 752 células/cm² distribuídas em 2 mL de meio DMEM suplementado com 15% de SBF por placa. As células foram mantidas durante 14 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e a troca de meio foi feita no sétimo dia. Após o período de cultura foi feita a coloração das colônias.

Para este procedimento, o meio de cultura foi retirado placas de Petri, estas foram lavadas duas vezes com PBS e coradas com a solução de cristal violeta 1% (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) diluída em metanol (Merck, Darmstadt, Germany), durante 10 minutos a temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com água destilada e foram deixadas na posição invertida sobre um papel toalha até a secagem completa (protocolo adaptado de Meireles e Nardi, 2003).

Foram consideradas como colônias agrupamentos com mais de 50 células. A contagem do número de colônias em cada placa foi feita em lupa (Nikon, Japan) com aumento de 10 x 21. Foram consideradas as médias do número de CFU-F obtidas em cada duplicata.

3 – RESULTADOS

3.1 - Isolamento de células mononucleares e cultivo de células tronco mesenquimais

3.1.2 – Medula óssea

O número total de células mononucleares isoladas em cada amostra variou de $1,08 \times 10^6$ a $99,25 \times 10^6$ células. A média de células por mL foi de $12,29 \times 10^6$. Os resultados estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1 – Volume de medula óssea coletada da região proximal do fêmur de gato, número de células mononucleares isoladas, número de células por mL e viabilidade celular por amostra.

Amostra	Volume (ml)	Células	Células/ml	Viabilidade(%)
1	5	60.000.000	12.000.000	93
2	5	55.000.000	11.000.000	96
3	3,5	68.000.000	19.428.571	90
4	5	45.500.000	9.100.000	95
5	5	59.000.000	11.800.000	96
6	3	19.500.000	6.500.000	60
7	3	40.000.000	13.333.333	90
8	3	75.000.000	25.000.000	99,20
9	1	1.080.000	1.080.000	99,20
10	6	89.000.000	14.833.333	95
11	3	27.500.000	9.166.667	99,45
12	5	99.250.000	19.850.000	99,20
13	5	54.500.000	10.900.000	99,63
14	5	40.800.000	8.160.000	93
Média	4,11	52.437.857	12.296.565	93,20

Em 12 amostras das 14 coletadas, as células mononucleares isoladas aderiram ao frasco de cultivo e se multiplicaram até atingir 80-90% de confluência (Figura 1). Quando atingiram o número necessário para cada procedimento, as células foram utilizadas para diferenciação, estudos de morfologia, citometria de

fluxo e ensaios clonogênicos. Nas três primeiras amostras as células não foram contadas nas diferentes passagens. Na amostra nove não houve confluência e na amostra 10 ocorreu “contaminação” com células arredondadas que eram semelhantes às hematopoiéticas (Figura 2). Mesmo com as trocas de meio as células hematopoiéticas permaneceram aderidas. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Número de células mononucleares isoladas das amostras de MO e número de células em cada passagem.

Amostra	Células	P1	P2	P3
1	60.000.000	P1-P2	P2-P3	
2	55.000.000	P1-P2		
3	68.000.000	P1-P2	P2-P3	P3-P4
4	45.500.000	2.250.000	9.900.000*	1.350.000
5	59.000.000	4.600.000	7.000.000	7.700.000*
6	19.500.000	3.100.000		
7	40.000.000	2.500.000	5.800.000	5.050.000*
8	75.000.000	12.000.000	11.000.000	8.750.000*
9	1.080.000	-		
10	27.500.000	-		
11	89.000.000	5.700.000		
12	99.250.000	7.800.000	4.500.000	
13	54.500.000	2.250.000	2.900.000*	
14	40.800.000	4.200.000	8.000.000	2.850.000*

(*) Células foram separadas para procedimentos de diferenciação, morfologia e citometria de fluxo e ensaio clonogênico. Na amostra nove não houve confluência e na amostra 10 ocorreu “contaminação” com células aparentemente hematopoiéticas.

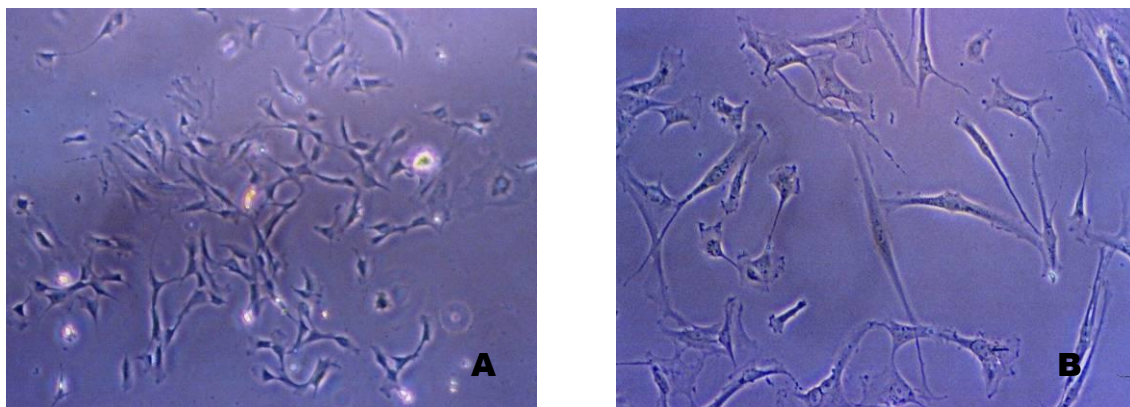


Figura 1: Células tronco mesenquimais de gato isoladas de MO com quatro dias de cultivo. A) Aumento de 40x ; B) Aumento de 100x.

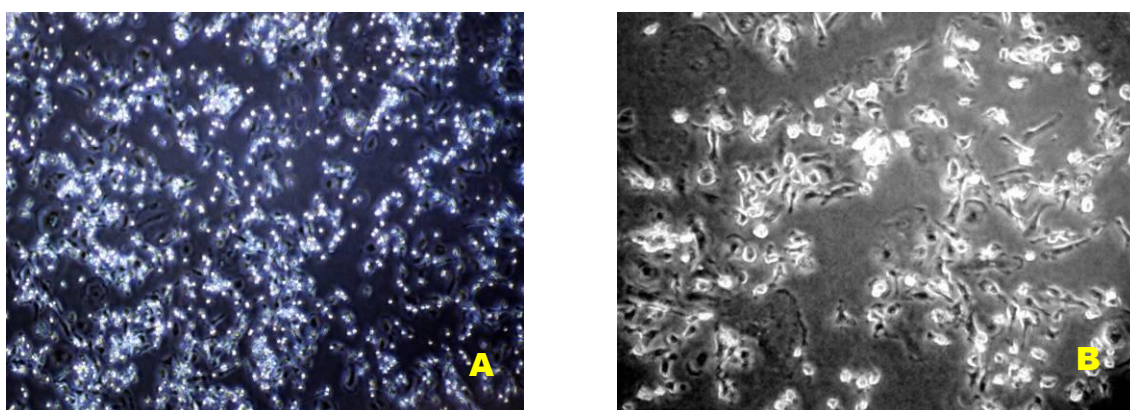


Figura 2: Cultivo celular observando-se poucas CTMs e células esféricas aderidas em grande quantidade, com cinco dias de cultivo. A) Aumento de 40x ; B) Aumento de 100x.

Das 14 amostras, duas linhagens celulares isoladas apresentaram sinais de morte celular com vacuolização do núcleo e posteriormente fragmentação celular, sinais típicos de *cariorexis* (figura 3).

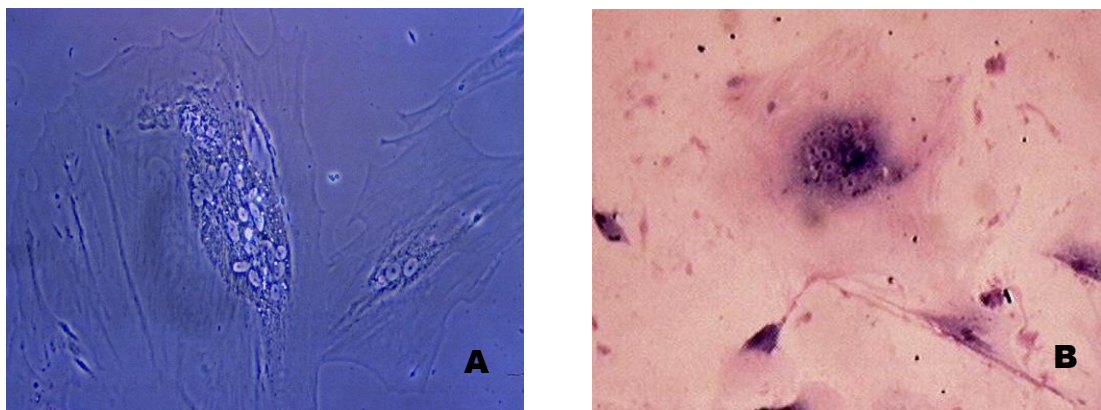


Figura 3: Célula apresentando sinais de morte celular com vacuolização do núcleo e pouca basofilia citoplasmática. A) Aumento de 100x. B) Coloração com *Wright*, aumento de 100x.

3.1.2 Tecido adiposo

As amostras de tecido adiposo coletadas nas cirurgias foram pesadas e após o processo de digestão tecidual com a colagenase as células foram contadas e a viabilidade celular foi verificada. Os resultados estão na tabela 3.

Tabela 3 - Tecido adiposo coletado durante cirurgia de OSH de gatas. Quantidade, número de células isoladas por amostra, número total de células por grama e viabilidade celular.

Amostra	Quantidade (g)	N° de células	N° células/g	Viabilidade(%)
1	3,025	1.400.000	462.810	83
2	7,029	2.350.000	334.329	73
3	4,05	400.000	98.765	90
4	7,1	90.000	12.857	90
5	4,9	2.500.000	510.204	73
Média	4,6208	1.348.000	284.070	81,8

Ao atingirem 80% de confluência as células foram replaqueadas na proporção de 1:2, para expansão celular. As células foram contadas em câmara de Neubauer a cada passagem. O número de células por passagem está demonstrado na tabela 4. Quando atingiam a quantidade necessária, as células foram usadas nos procedimentos de diferenciação, morfologia, citometria de fluxo e ensaio clonogênico. As células foram observadas diariamente (Figura 4).

Tabela 4 – Número de células obtidas nas passagens durante o cultivo de CTMs derivadas do TA de gatos.

Amostra	Células	P1	P2	P3	P4
1	1.400.000	210.000	2.650.000	4.250.000	1.140.000
2	2.350.000	1.650.000	2.400.000	3.750.000*	-
3	400.000	-			
4	90.000	1.050.000	1.700.000	2.300.000	3.250.000*
5	2.500.000	2.250.000	8.950.000	7.400.000*	

(*) Células foram separadas para procedimentos de diferenciação, morfologia, citometria de fluxo e ensaio clonogênico.

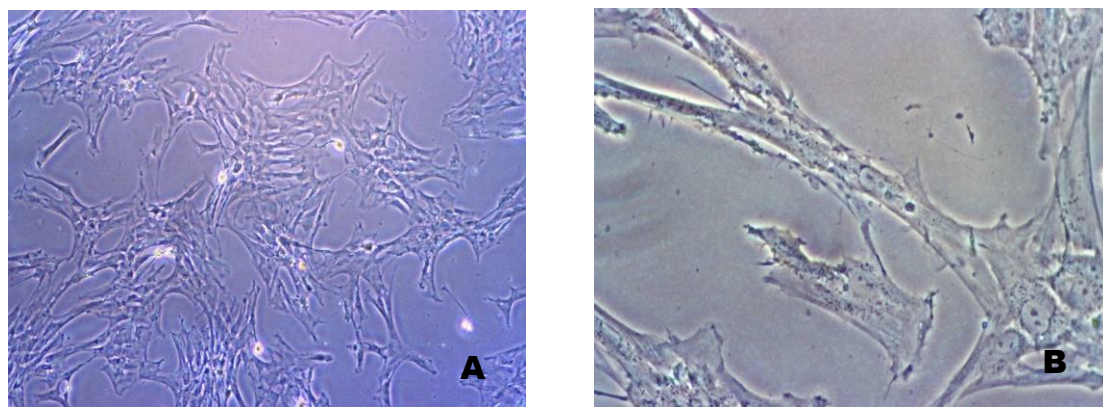


Figura 4: Células tronco mesenquimais de gato isoladas de TA, com cinco dias de cultivo. A) Aumento de 40x. B) Aumento de 200x.

3.2 – Diferenciação das CTMs derivadas do tecido adiposo nas linhagens osteoblástica, condrocítica e adipocítica

3.2.1 – Células isoladas da medula óssea

Das seis amostras de CTMs isoladas de MO, em quatro observou-se a diferenciação nas linhagens osteoblástica, condrocítica e adipocítica. Os resultados estão na tabela 5. Na amostra 5 ocorreu contaminação fúngica e na amostra 7 as células apresentaram padrão de morte celular com *cariorex* e posterior fragmentação

citoplasmática. A diferenciação foi avaliada qualitativamente por meio de análise da morfologia celular e citoquímica.

Tabela 5 – Diferenciação das CTMs nas linhagens osteoblástica, condrocítica e adipocítica.

Amostra	Osteoblástica	Condrocítica	Adipocítica
4	+	-	+
8	+	-	+
13	+	+	+
14	+	+	+

(+) Positivo; (-) Não foi possível fazer a análise.

A diferenciação osteogênica foi verificada pela visualização da mineralização da matriz extracelular corada com Vermelho de Alizarina S com pH 4,2 e 7,0, o qual cora os cristais de cálcio (Figura 5).

Na diferenciação condrogênica as CTMs formaram botões de células que ficaram suspensas no meio de cultura. Cortes histológicos dos botões celulares foram corados com Azul de Toluidina, o qual cora proteoglicanas sulfatadas da matriz cartilaginosa. Foi observada uma estrutura condensada com células cubóides e presença de lacunas ao redor dos condrócitos jovens (Figura 6). Duas amostras (conforme tabela 5) demonstraram a presença das lacunas ao redor dos condrócitos.

A presença de vacúolos ricos em lipídeos corados com Oil-Red foi utilizada para detectar a indução adipogênica. As CTMs isoladas do TA apresentaram células pavimentosas grandes com vacúolos ricos em lipídeos no citoplasma (Figura 7).

As culturas do grupo controle que foram cultivadas com meio sem a adição de indutores de diferenciação não demonstraram formação espontânea em osteoblastos, condrócitos ou adipócitos após 14 dias de cultivo.

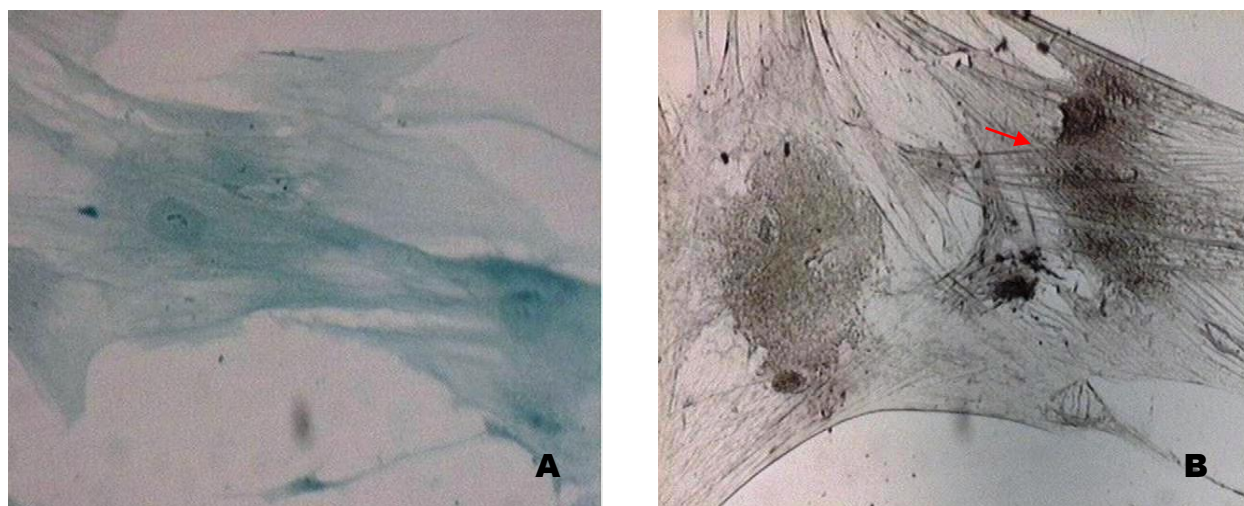


Figura 5: Diferenciação em osteoblastos das CTMs isoladas da MO. Após 21 dias de indução foi possível observar mineralização da matriz extracelular (seta) das amostras cultivadas com meio de diferenciação, após coloração com vermelho de Alizarina S (pH 7,0). A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

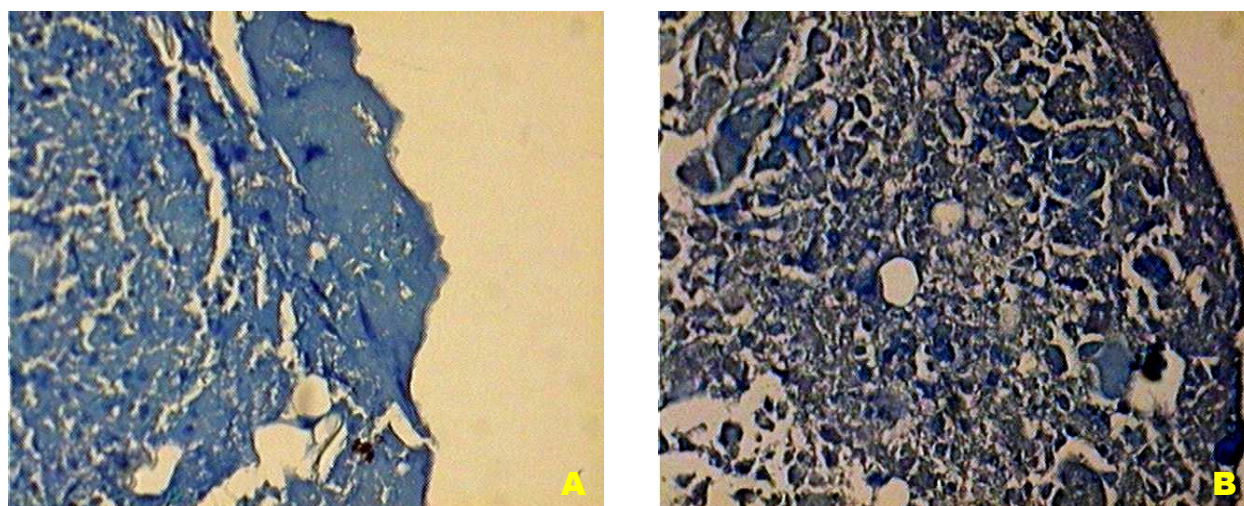


Figura 6: Diferenciação em condrócitos das CTMs isoladas da MO. Após 21 dias de indução a diferenciação em condrócitos foi possível observar a formação da matriz de proteoglicanas e as lacunas (setas), características morfológicas de condrócitos. Coloração com azul de toluidina. A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

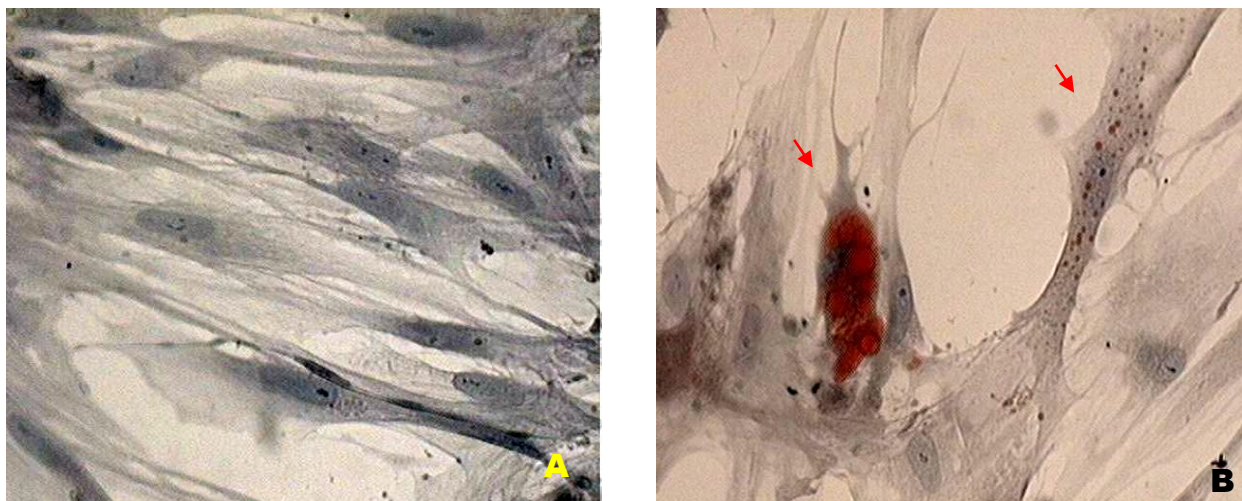


Figura 7: Diferenciação em adipócitos das CTMs da MO. Após 21 dias de cultivo de indução a diferenciação adipogênica, foram observadas células com citoplasma com vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (setas), nas células cultivadas em meio de diferenciação. A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

3.2.2 – Células isoladas do tecido adiposo

Em três das cinco amostras de TA coletadas foi possível obter células para procedimentos de diferenciação nas linhagens osteoblástica, condrocítica e adipocítica. As três amostras diferenciaram-se nas três linhagens. Na amostra 1 as células apresentaram sinais de morte celular com *cariorex* e posterior fragmentação citoplasmática em P4 e na amostra 3 não houve expansão celular após o isolamento. A diferenciação foi avaliada qualitativamente por meio da análise da morfologia celular e citoquímica.

A diferenciação osteogênica foi verificada pela visualização da mineralização da matriz extracelular corada com Vermelho de Alizarina S com pH 4,2 e 7,0 (Figura 8).

Na diferenciação condrogênica as CTMs formaram botões celulares que ficavam suspensos no meio de cultura. Cortes histológicos dos botões celulares foram corados com Azul de Toluidina. O corte histológico apresentou estrutura

condensada com células cubóides e lacunas ao redor dos condrócitos jovens (Figura 9). Em três amostras foi observada a diferenciação condrogênica.

A presença de vacúolos ricos em lipídeos corados com Oil-Red O foram utilizados para detectar a indução adipogênica. As CTMs isoladas do TA apresentaram células pavimentosas grandes com vacúolos ricos em lipídeos no citoplasma (Figura 10).

As culturas do grupo controle cultivadas sem os indutores de diferenciação não demonstraram formação espontânea em osteoblastos, condrócitos ou adipócitos após 21 dias de cultivo.

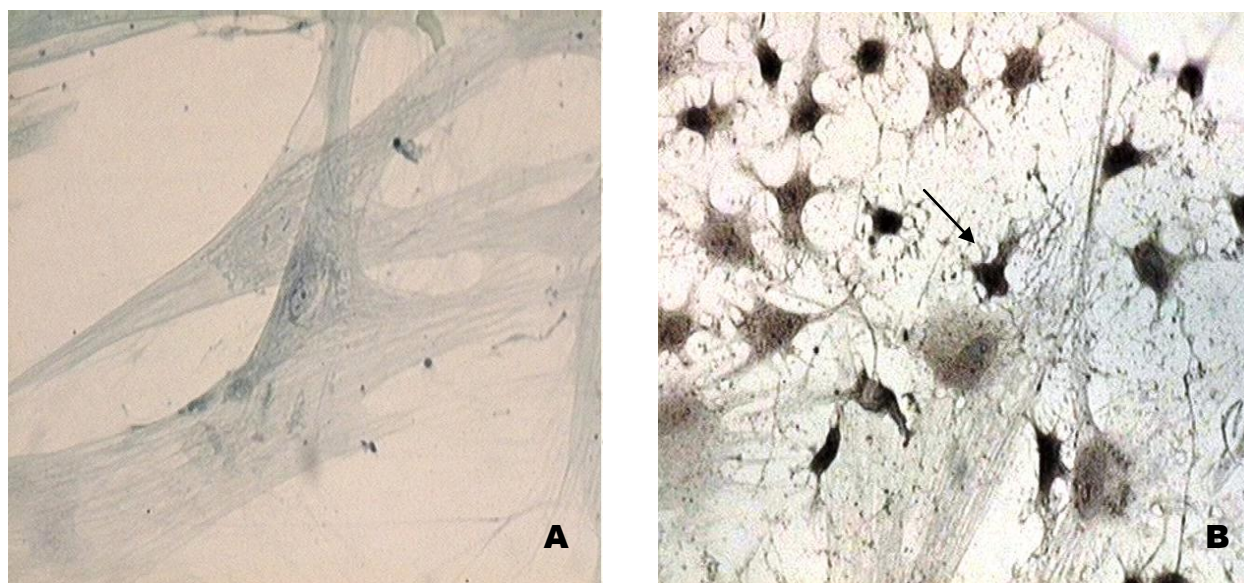


Figura 8: Diferenciação em osteoblastos das CTMs isoladas do TA. Após 21 dias de indução a diferenciação, foi possível observar mineralização da matriz extracelular (seta) nas amostras cultivadas com meio de diferenciação, após coloração com vermelho de Alizarina S (pH 7,0). A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

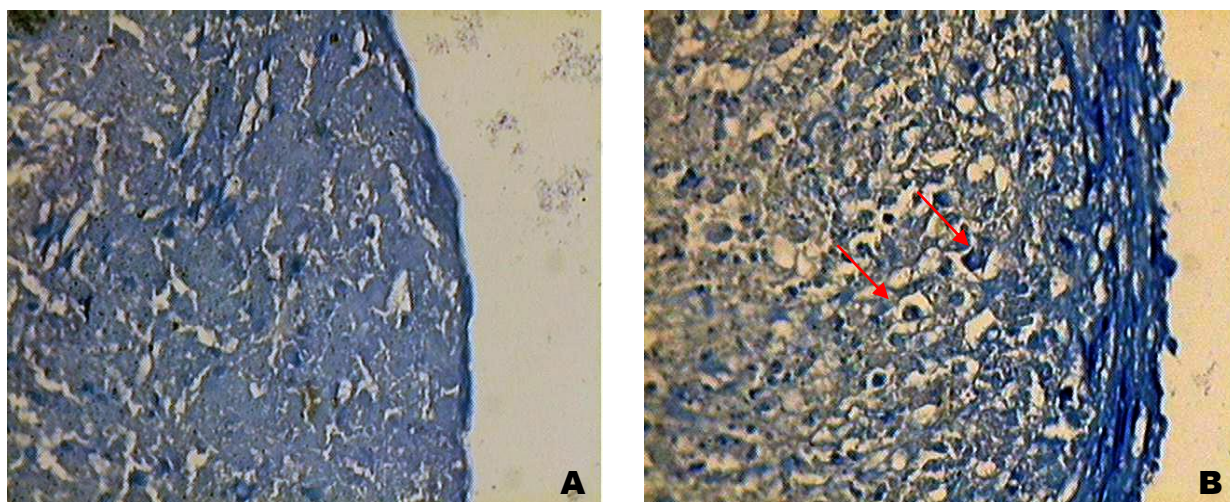


Figura 9: Diferenciação em condrócitos das CTMs isoladas do TA. Após 21 dias de indução a diferenciação em condrócitos foi possível observar a deposição de proteoglicanos e as lacunas (setas), características morfológicas de condrócitos. Coloração com azul de toluidina. A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

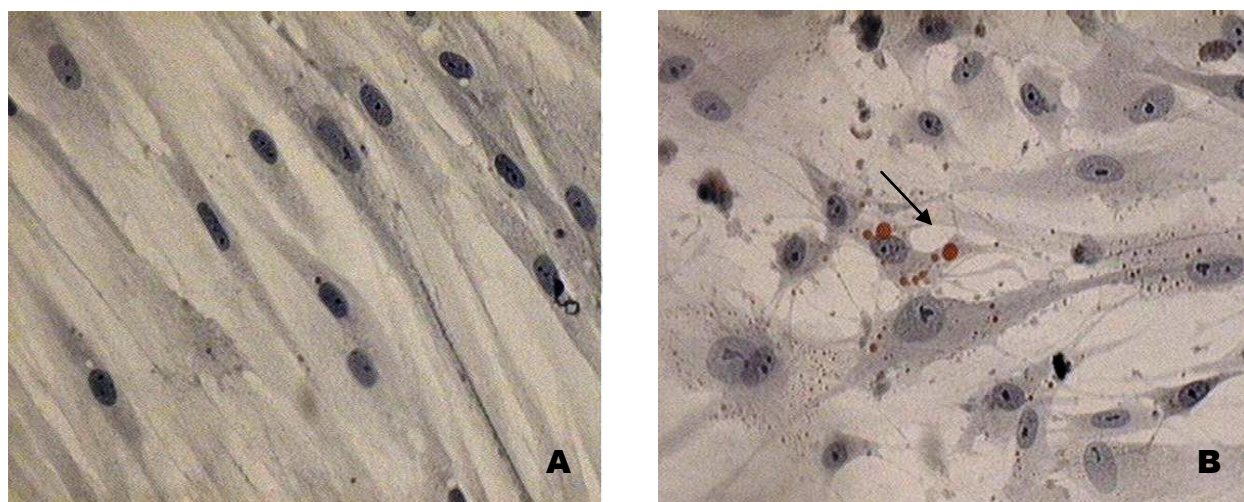


Figura 10: Diferenciação em adipócitos de CTMs do TA. Após 21 dias de cultivo de indução a diferenciação adipogênica, foram observadas células com citoplasma com vacúolos lipídicos corados com Oil Red O (seta), nas células cultivadas em meio de diferenciação. A) Amostra cultivada com meio controle; B) Amostra cultivada com meio de diferenciação. Aumento de 400x.

3.3 Estudo da morfometria e morfologia das CTMs

3.3.1 Células isoladas da Medula Óssea

Os valores médios obtidos na morfometria do comprimento das CTMs de MO de gato, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Média em μm e desvio padrão do comprimento das CTMs de três amostras de MO.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
4	P1	106,97 \pm 38,16	125,86 \pm 55,15	136,65 \pm 51,23	170,51 \pm 66,29
	P3	177,91 \pm 71,61	139,72 \pm 54,88	186,51 \pm 78,07	210,88 \pm 96,51
13	P1	106,08 \pm 26,33	119,11 \pm 44,21	130,42 \pm 40,97	165,83 \pm 56,08
	P3	173,98 \pm 90,08	158,36 \pm 69,46	219,54 \pm 80,93	239,15 \pm 94,24
14	P1	107,52 \pm 35,97	110,14 \pm 53,45	143,80 \pm 56,51	156,60 \pm 52,00
	P3	140,96 \pm 57,52	469,78 \pm 159,69	438,88 \pm 152,34	488,02 \pm 133,64

P* - Passagem.

Os valores médios obtidos na morfometria da largura das CTMs de MO, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 7.

Tabela 7: Média em μm e desvio padrão da largura das CTMs de três amostras de MO.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
4	P1	30,79 \pm 16,75	36,21 \pm 21,22	31,38 \pm 16,04	34,63 \pm 17,29
	P3	40,18 \pm 20,46	36,06 \pm 17,81	34,31 \pm 18,90	39,55 \pm 21,30
13	P1	37,55 \pm 19,98	35,92 \pm 16,06	32,62 \pm 19,82	42,35 \pm 26,28
	P3	36,27 \pm 12,60	27,50 \pm 9,23	36,68 \pm 20,42	37,76 \pm 12,60
14	P1	27,12 \pm 8,67	27,74 \pm 14,55	26,78 \pm 9,39	34,98 \pm 17,65
	P3	37,51 \pm 17,45	36,38 \pm 18,35	52,28 \pm 32,97	49,97 \pm 27,32

P* - Passagem.

Os resultados obtidos na morfometria do comprimento dos núcleos das CTMs da MO, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 8.

Tabela 8: Média em μm e desvio padrão do comprimento dos núcleos de CTMs de três amostras de MO.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
4	P1	16,28 \pm 3,02	17,10 \pm 2,61	19,09 \pm 3,64	21,29 \pm 4,13
	P3	26,35 \pm 3,39	21,43 \pm 4,03	23,12 \pm 5,21	25,22 \pm 5,83
13	P1	17,75 \pm 2,78	19,20 \pm 4,24	19,76 \pm 4,84	22,91 \pm 4,75
	P3	26,76 \pm 6,59	22,53 \pm 3,74	24,04 \pm 5,66	31,56 \pm 5,48
14	P1	20,99 \pm 3,47	18,92 \pm 3,70	21,23 \pm 4,09	25,16 \pm 4,83
	P3	21,87 \pm 2,82	31,37 \pm 4,78	28,76 \pm 6,71	32,79 \pm 5,90

P* - Passagem.

Os resultados obtidos na morfometria da largura dos núcleos das CTMs da MO, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 9.

Tabela 9: Média em μm e desvio padrão da largura dos núcleos nas CTMs de três amostras de MO.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
4	P1	11,91 \pm 2,37	12,71 \pm 2,53	13,38 \pm 2,54	13,72 \pm 2,47
	P3	16,89 \pm 1,72	15,21 \pm 3,07	15,06 \pm 3,18	16,12 \pm 4,00
13	P1	13,06 \pm 2,32	13,87 \pm 2,92	13,62 \pm 2,90	15,77 \pm 4,05
	P3	16,68 \pm 3,99	13,29 \pm 1,76	15,72 \pm 3,51	17,85 \pm 3,56
14	P1	12,71 \pm 1,94	12,26 \pm 1,82	13,96 \pm 2,65	16,31 \pm 2,94
	P3	14,00 \pm 2,22	14,62 \pm 3,17	16,02 \pm 3,72	15,74 \pm 3,55

P* - Passagem.

Nos cultivos de CTMs obtidas de MO verificou-se o predomínio de duas formas: as células pavimentosas, grandes com citoplasma abundante e as fusiformes com maior comprimento, menor quantidade de citoplasma, núcleo esférico central. Essas células apresentaram variações quanto à forma dos seus prolongamentos citoplasmáticos, observando-se células delgadas com longos prolongamentos citoplasmáticos em ambos os lados (Figura 11), células com prolongamentos citoplasmáticos em forma de “Y” (figura 12) e outras células menores com maior quantidade de citoplasma em um dos lados (figura 13). As células pavimentosas, grandes, com citoplasma abundante e irregular também apresentaram variações quanto a sua forma, observando-se células de formato retangular (figura 14) e de formato arredondado (figura 15). Também foram encontradas células pavimentosas com predomínio basofílico no citoplasma ao redor do núcleo e prolongamentos citoplasmáticos com pouca basofilia (figura 16). Essas células foram mais freqüentes em P1. Também foram encontradas células menores, esféricas, com núcleo excêntrico e citoplasma com intensa basofilia, também mais

freqüentes em P1 (figura 17). Células com mais de um núcleo foram raramente encontradas (figura 18). Alguns osteoclastos também foram encontrados (figura 19).

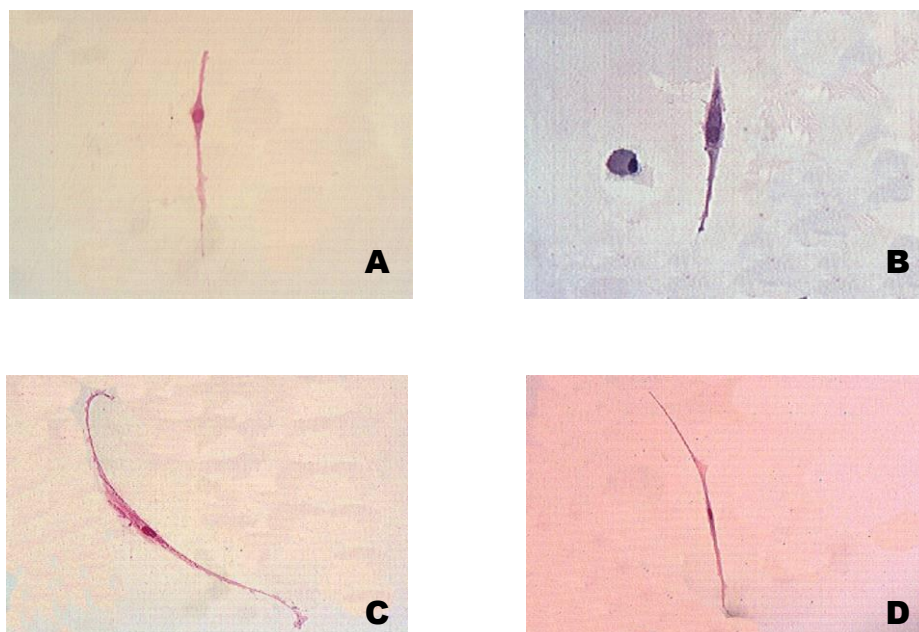


Figura 11: Células mesenquimais (CMs) isoladas da MO (Coloração com o corante de *Wright*). Células fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos delgados. A) P3, 48h, 200x; B) P1, 72h, 200x; C) P3, 72h, 200x; D) P3, 48h, 100x.

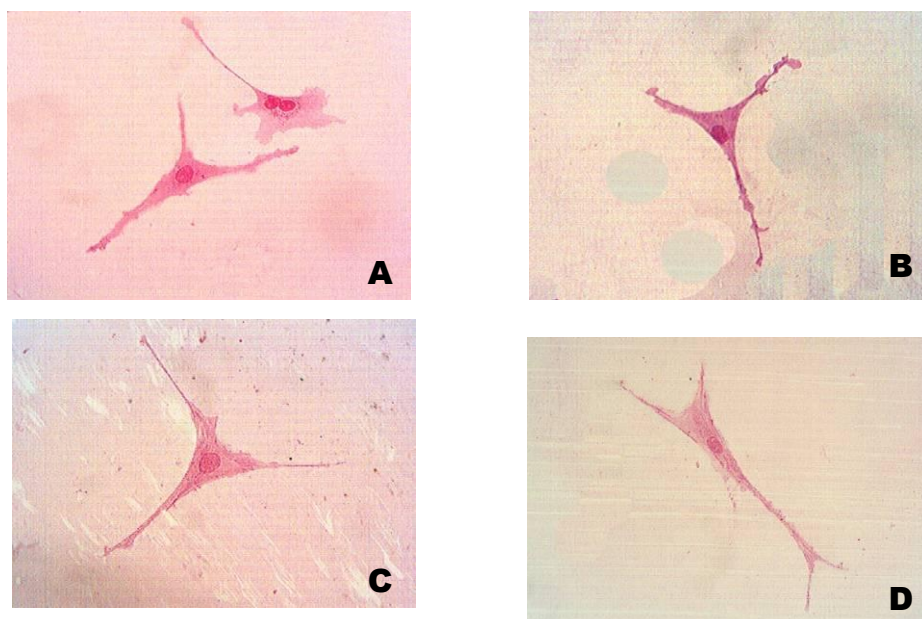


Figura 12: CMs isoladas da MO (Coloração com o corante de *Wright*). Células com prolongamentos citoplasmáticos formando um "Y". A) P3, 72h, 200x; B) P3, 24h, 200x; C) P3, 48h, 200x; D) P3, 120h, 200x.

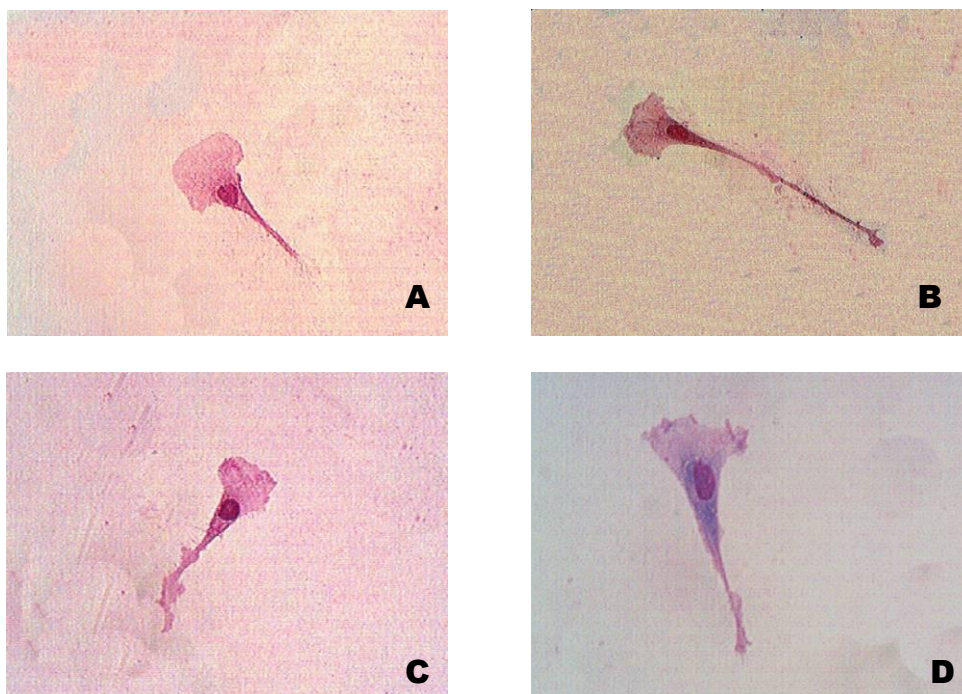


Figura 13: CMs isoladas da MO (Coloração com o corante de *Wright*). Células com citoplasma abundante em uma de suas extremidades. A) P3, 120h, 200x; B) P3, 72h, 200x; C) P3, 120h, 200x; D) P1, 24h, 400x.

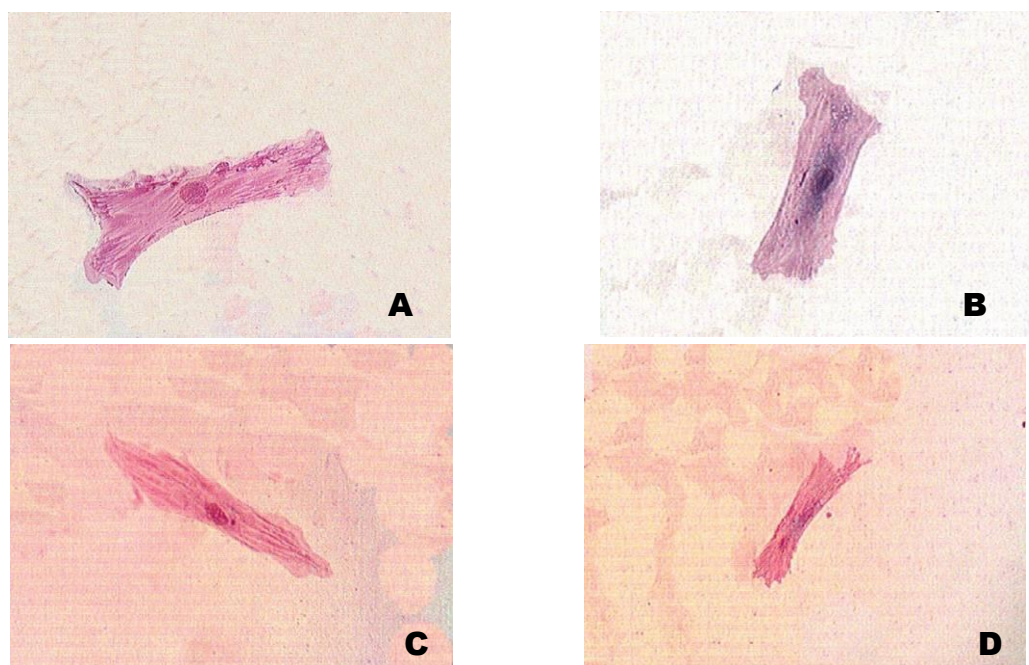


Figura 14: CMs isoladas da MO (Coloração com o corante *Wright*). Células pavimentosas de formato retangular. A) P3, 120h, 200x; B) P1, 72h, 200x; C) P3, 120h, 200x; D) P3, 72h, 100x.

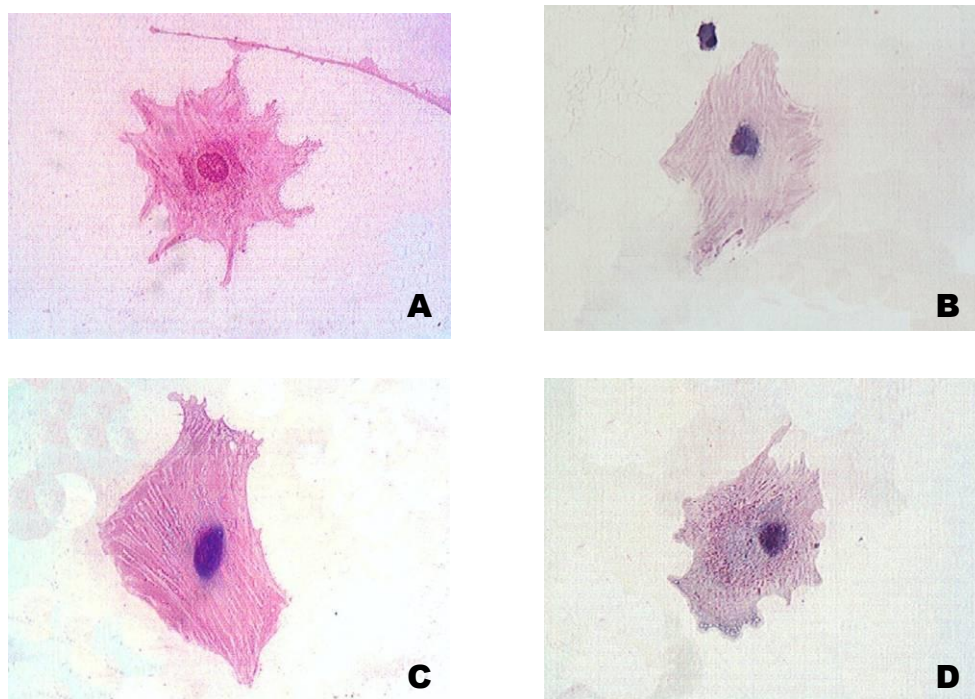


Figura 15: CMs isoladas da MO (Coloração com o corante *Wright*). Células pavimentosas com citoplasma abundante: A) P3, 24h, 400x; B) P1, 48h, 200x; C) P1, 120h, 400x; D) P1, 120h, 200x.

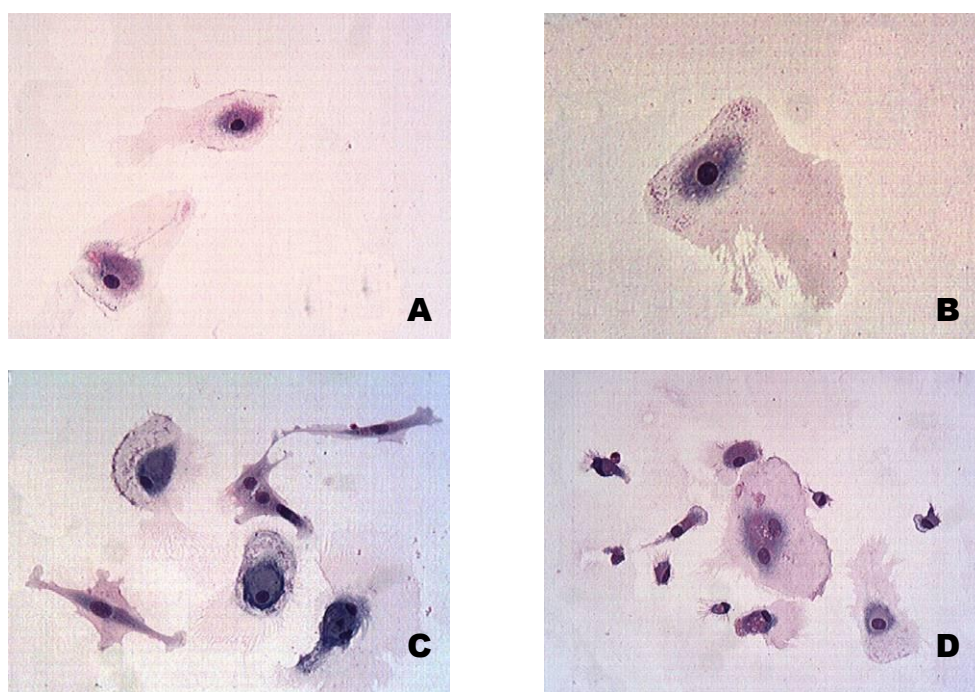


Figura 16: Células com basofilia ao redor do núcleo e citoplasma com pouca basofilia isoladas da MO (Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 24h, 200x; B) P1, 120h, 200x; C) P1, 120h, 200x; D) P1, 120h, 200x.

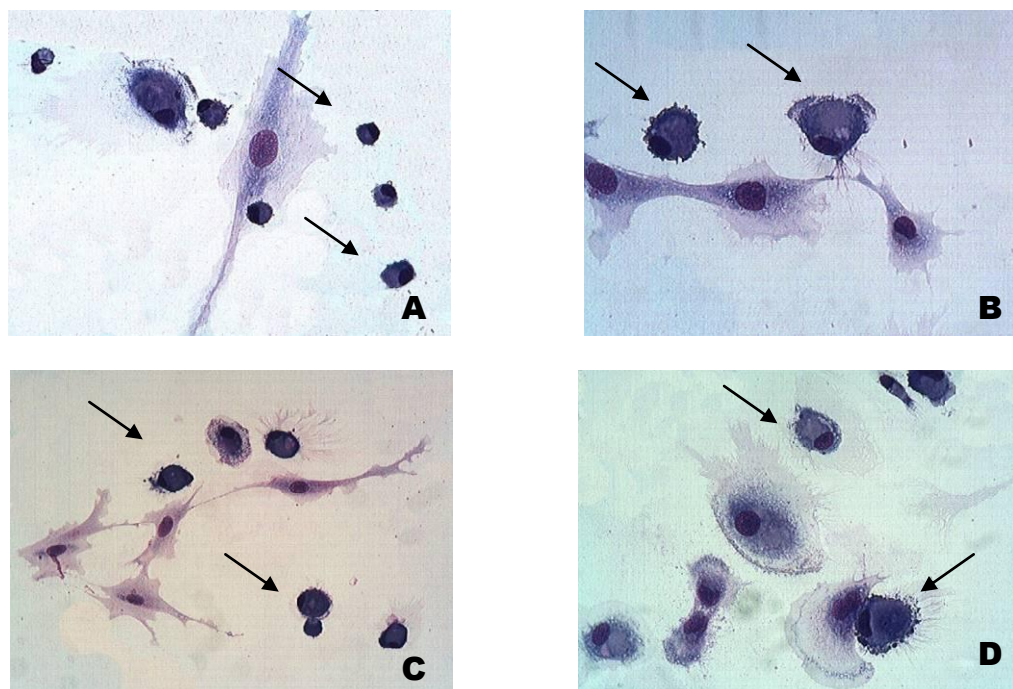


Figura 17: Células esféricas com intensa basofilia isoladas da MO (setas) (Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 72h, 200x; B) P1, 48h, 400x; C) P1, 120h, 200x; D) P1, 48h, 200x.

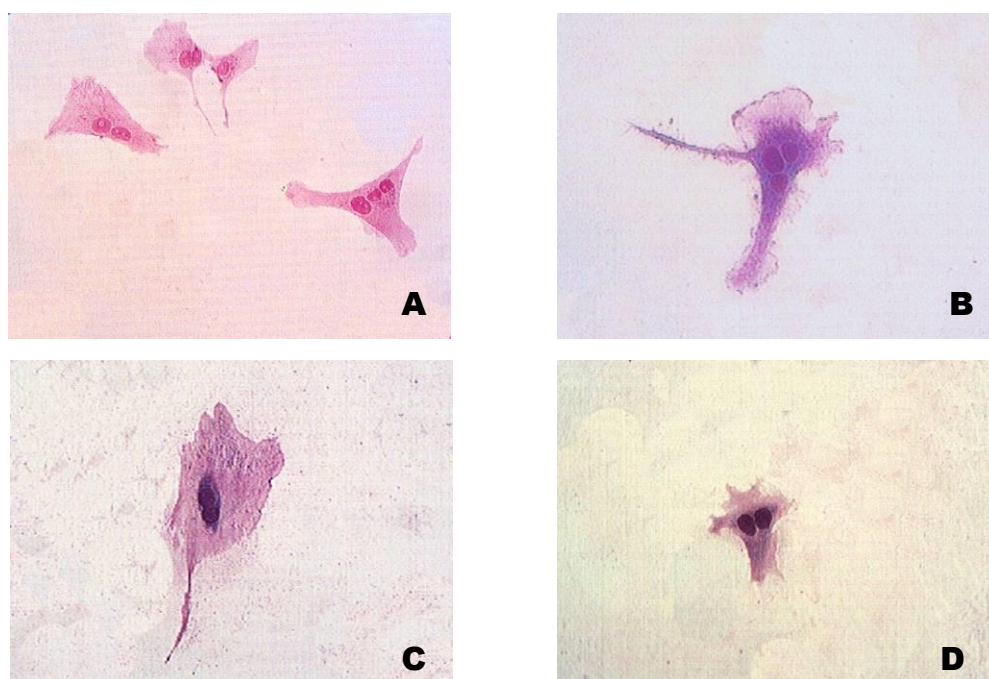


Figura 18: Células multinucleadas isoladas da MO (Coloração com o corante *Wright*). A) P3, 48h, 200x; B) P1, 48h, 400x; C) P1, 72h, 200x; D) P1, 72h, 200x.

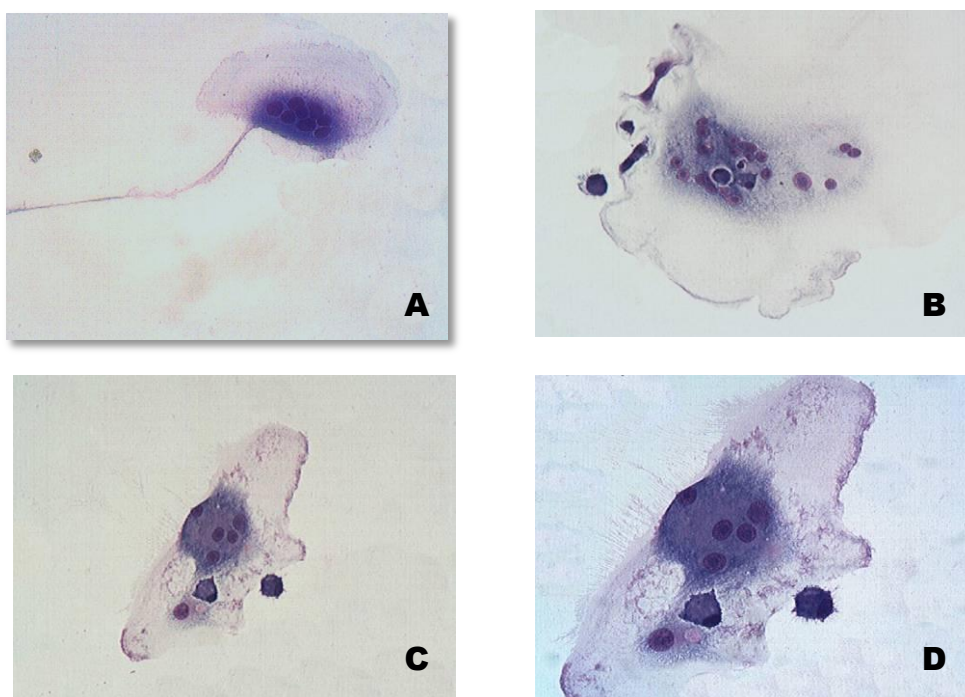


Figura 19: Osteoclastos encontrados nos ensaios de morfologia de CTMs isoladas da MO (Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 48h, 200x; B) P1, 72h, 200x; C) P1, 120h, 200x; D) P1, 120h, 400x.

3.3.1 Células isoladas do Tecido Adiposo

Os valores médios obtidos na morfometria do comprimento das CTMs de TA de gato, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 10.

Tabela 10: Média em μm e desvio padrão do comprimento das CTMs de três amostras de TA.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
2	P1	109,61 \pm 56,86	140,09 \pm 51,88	176,78 \pm 81,12	247,92 \pm 94,64
	P3	155,47 \pm 74,68	175,11 \pm 71,75	300,75 \pm 102,45	392,96 \pm 120,20
4	P1	277,76 \pm 68,73	286,02 \pm 112,49	243,54 \pm 75,30	262,12 \pm 126,06
	P3	152,88 \pm 52,12	141,40 \pm 50,98	196,76 \pm 85,43	162,23 \pm 56,26
5	P1		130,77 \pm 46,14	139,72 \pm 37,81	179,94 \pm 45,47
	P3	161,69 \pm 64,18	183,17 \pm 63,89	187,48 \pm 47,58	254,81 \pm 76,81

P* - Passagem

Os valores médios obtidos na morfometria da largura das CTMs de TA, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 11.

Tabela 11: Média em μm e desvio padrão da largura das CTMs de três amostras de TA.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
2	P1	24,7 \pm 7,05	26,58 \pm 9,13	29,07 \pm 10,53	28,07 \pm 12,91
	P3	34,86 \pm 20,45	41,10 \pm 17,52	39,29 \pm 21,77	37,88 \pm 16,82
4	P1	35,70 \pm 20,50	35,81 \pm 19,32	31,69 \pm 7,89	30,45 \pm 10,67
	P3	28,26 \pm 12,72	30,48 \pm 19,67	37,77 \pm 28,90	33,05 \pm 17,15
5	P1		22,21 \pm 9,57	23,35 \pm 7,38	28,86 \pm 10,67
	P3	35,26 \pm 16,66	29,81 \pm 12,32	38,81 \pm 18,98	53,11 \pm 30,15

P* - Passagem

Os valores médios obtidos na morfometria do comprimento dos núcleos das CTMs de TA, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 12.

Tabela 12: Média em μm e desvio padrão do comprimento dos núcleos das CTMs de três amostras de TA.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
2	P1	17,92 \pm 2,87	20,46 \pm 3,20	20,80 \pm 4,88	23,06 \pm 5,13
	P3	22,17 \pm 4,01	23,53 \pm 3,66	29,84 \pm 5,24	32,17 \pm 4,70
4	P1	27,85 \pm 4,09	26,84 \pm 4,66	24,12 \pm 3,78	23,96 \pm 5,27
	P3	21,74 \pm 4,32	20,97 \pm 4,16	23,20 \pm 5,19	19,86 \pm 3,37
5	P1		20,41 \pm 3,95	21,45 \pm 3,42	25,10 \pm 5,05
	P3	23,69 \pm 3,81	26,02 \pm 4,90	26,31 \pm 3,64	28,64 \pm 4,61

P* - Passagem

Os valores médios obtidos na morfometria da largura dos núcleos das CTMs de TA, em períodos de cultivo de 24, 48, 72 e 120 horas, em P1 e P3, de três amostras, está demonstrado na tabela 13.

Tabela 13: Média em μm e desvio padrão da largura dos núcleos das CTMs de três amostras de TA.

Amostra	P*	24 horas	48 horas	72 horas	120 horas
2	P1	12,01 \pm 2,42	14,11 \pm 2,45	14,08 \pm 2,66	14,29 \pm 3,51
	P3	14,07 \pm 3,31	15,32 \pm 3,08	17,35 \pm 3,64	15,86 \pm 3,24
4	P1	16,40 \pm 2,85	13,95 \pm 2,62	15,00 \pm 2,53	14,72 \pm 3,02
	P3	13,92 \pm 3,28	13,16 \pm 2,78	14,14 \pm 4,00	13,20 \pm 2,25
5	P1		13,32 \pm 2,65	13,56 \pm 2,59	14,80 \pm 2,85
	P3	15,40 \pm 2,92	15,84 \pm 2,58	15,63 \pm 2,54	17,43 \pm 3,80

P* - Passagem

Nos cultivos das CTMs obtidas de TA verificou-se o predomínio de duas formas, as fusiformes e as pavimentosas com citoplasma abundante. As células fusiformes com maior comprimento, menor quantidade de citoplasma, núcleo esférico central. Essas células apresentaram variações quanto à forma dos seus prolongamentos citoplasmáticos, observando-se células delgadas com longos prolongamentos citoplasmáticos em ambos os lados (figura 20), células com prolongamentos citoplasmáticos em forma de “Y” (figura 21) e outras células menores com maior quantidade de citoplasma em um dos lados (figura 22). As células pavimentosas, grandes, com citoplasma abundante e irregular também apresentaram variações quanto a sua forma, observando-se células de formato retangular (figura 23) e células de formato arredondado (figura 24). Raramente encontrou-se células com mais de um núcleo (figura 25).

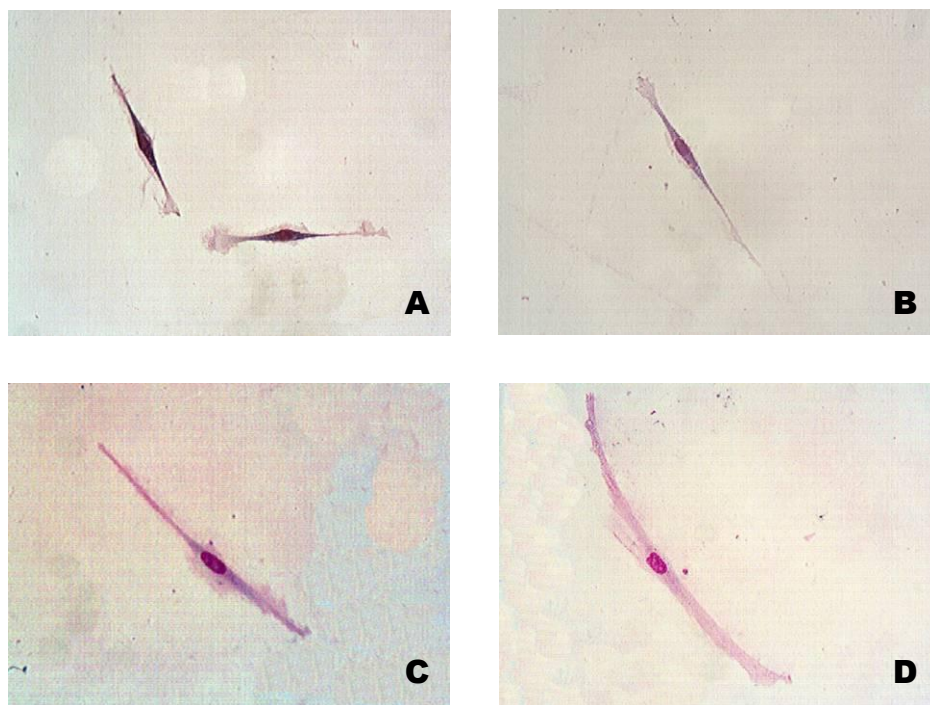


Figura 20: CMs isoladas do TA. Células fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos longos para ambos os lados isoladas do TA. (Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 48h, 200x; B) P1, 48h, 200x; C) P3, 24h, 200x; D) P3, 24h, 200x.

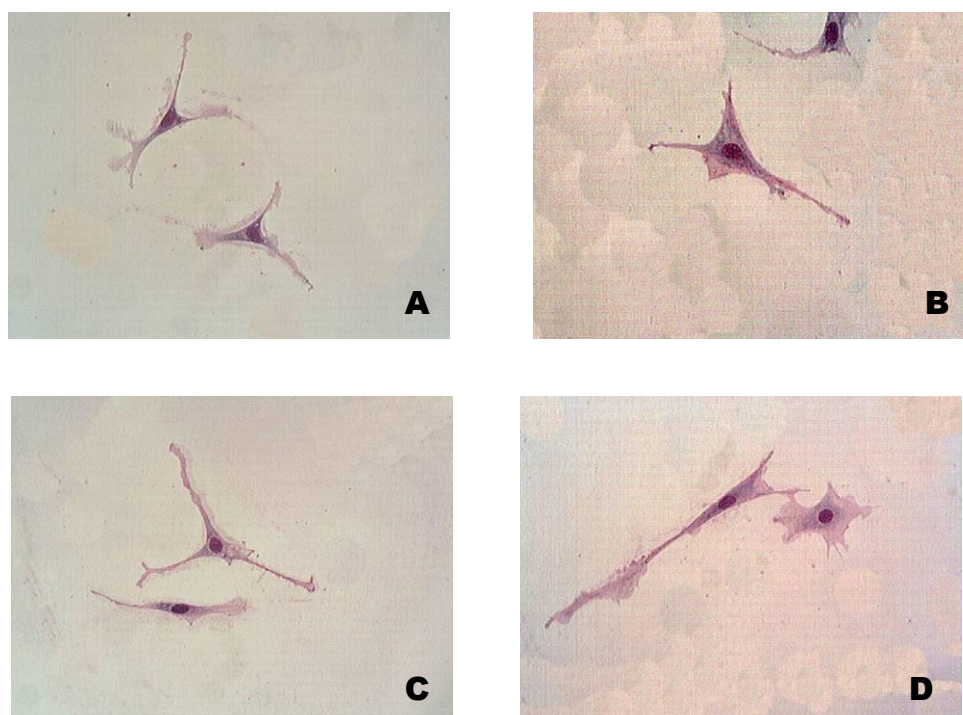


Figura 21: CMs isoladas do TA. Células fusiformes com prolongamentos citoplasmáticos em formato de “Y” isoladas do TA. Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 48h, 200x; B) P1, 72h, 200x; C) P3, 120h, 200x; D) P3, 72h, 200x.

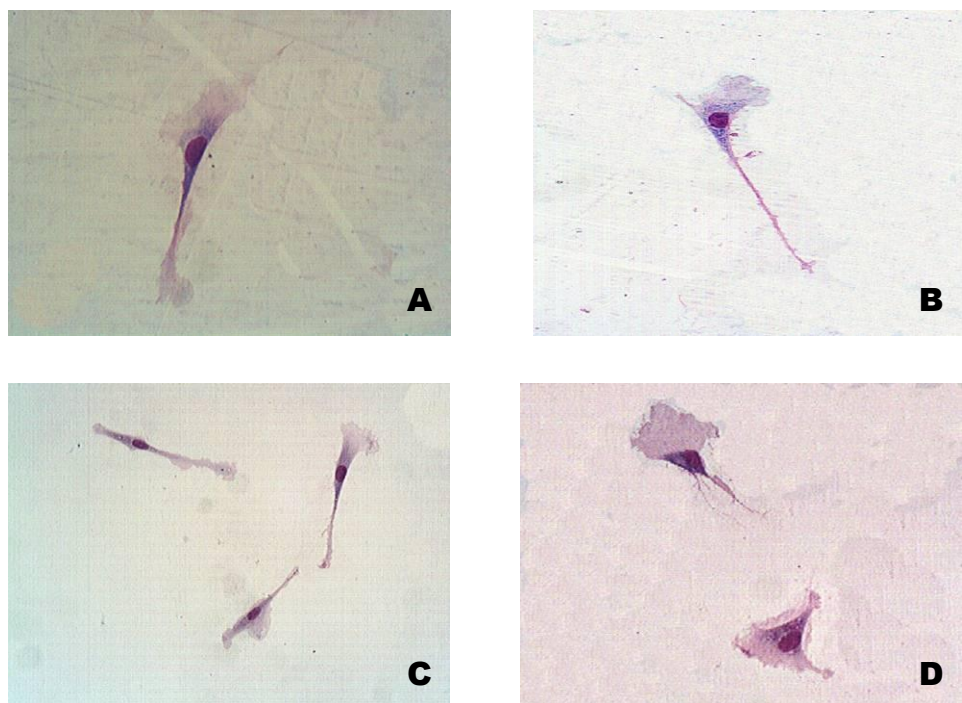


Figura 22: CMs isoladas do TA. Células com maior concentração de citoplasma em um dos lados. Coloração com o corante *Wright*). A) P3, 48h, 200x; B) P3, 48h, 200x; C) P3, 72h, 200x; D) P1, 48h, 200x.

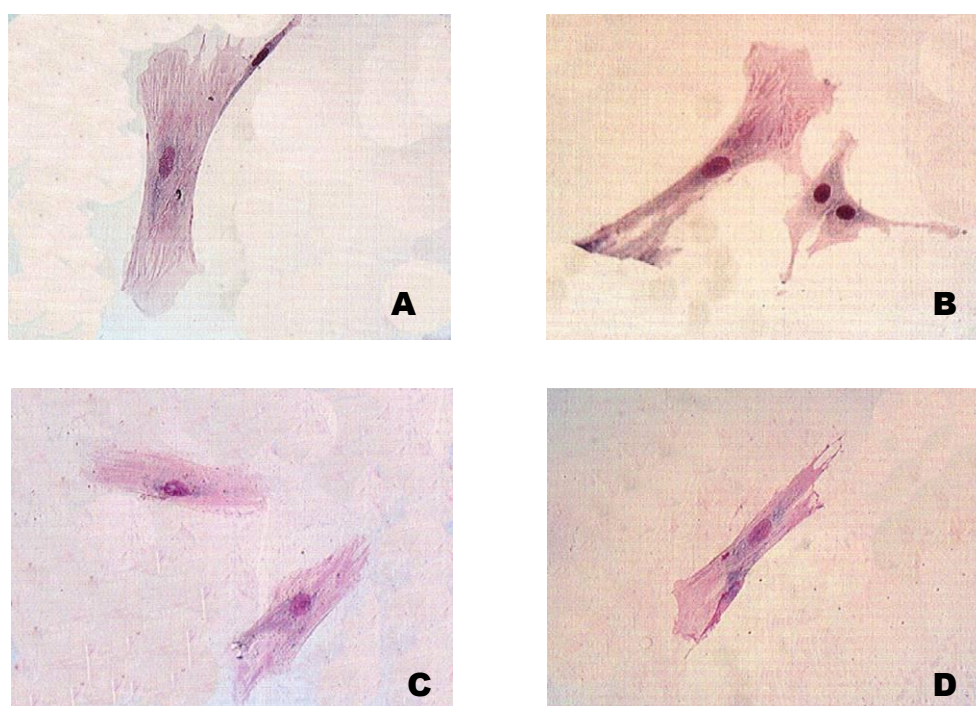


Figura 23: CMs isoladas do TA. Células pavimentosas de formato retangular. Coloração com o corante *Wright*). A) P3, 72h, 200x; B) P3, 120h, 200x; C) P1, 72h, 200x; D) P1, 120h, 200x.

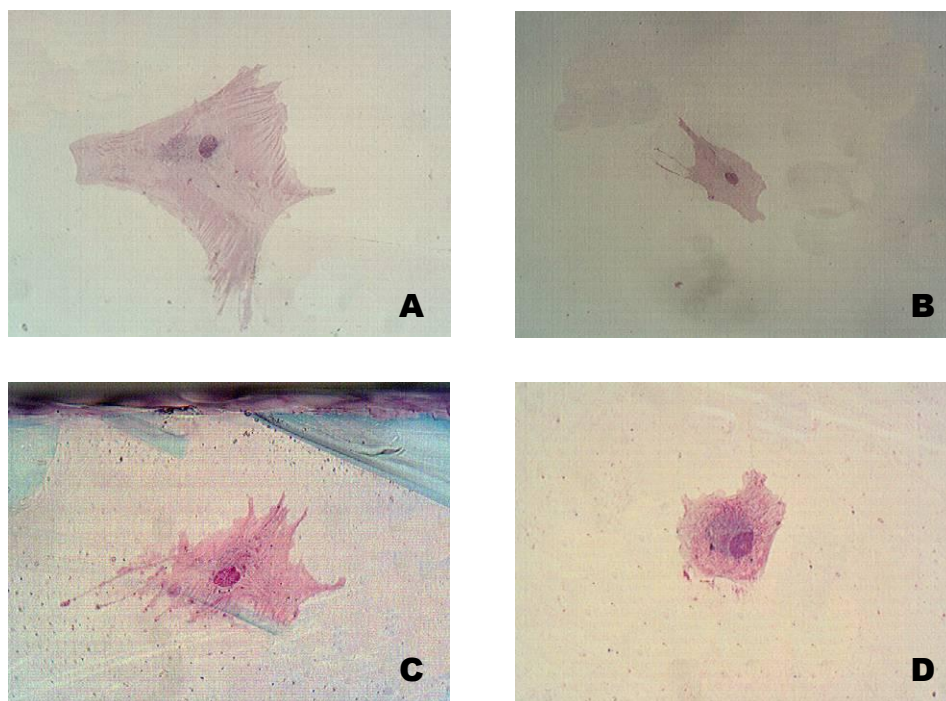


Figura 24: CMs isoladas do TA. Células pavimentosas com citoplasma abundantes. Coloração com o corante *Wright*). A) P3, 72h, 200x; B) P1, 48h, 200x; C) P3, 72h, 200x; D) P3, 48h, 200x.

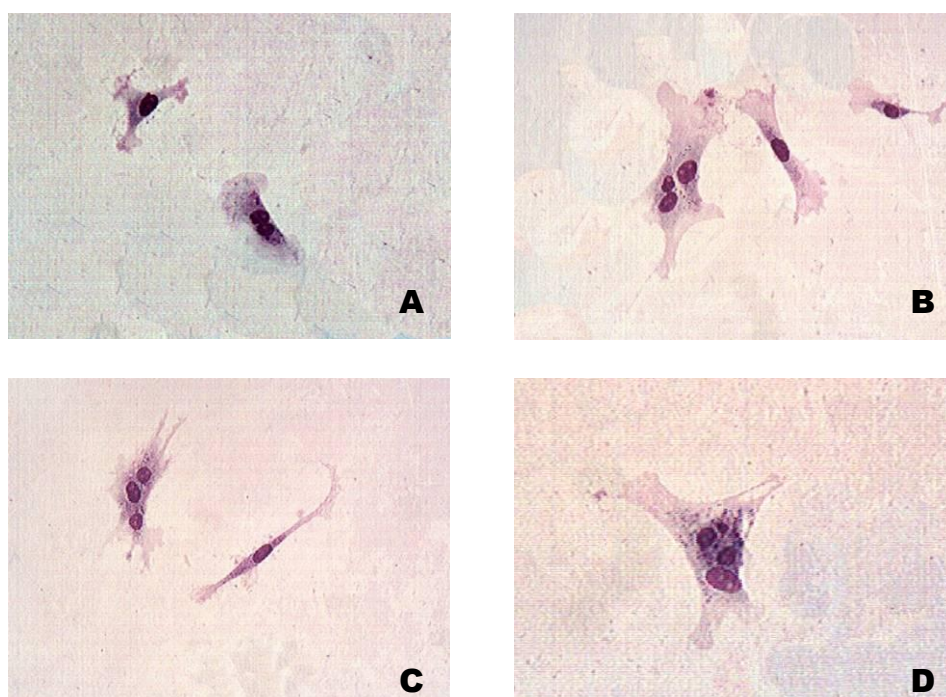


Figura 25: Células com mais de um núcleo isoladas do TA. Coloração com o corante *Wright*). A) P1, 24h, 200x; B) P1, 48h, 200x; C) P1, 72h, 200x; D) P1, 48h, 200x.

3.4 Perfil de antígenos da superfície celular

3.4.1 CTMs isoladas da Medula Óssea

A expressão de antígenos de superfície celular foi analisada por citometria de fluxo em três amostras das CTMs isoladas da medula óssea. Com poucas exceções, as três amostras demonstraram similaridade imunofenotípica para os marcadores analisados (Tabela 14 e Figura 26). As células foram positivas para o receptor endoglina CD 105, a integrina $\beta 1$ CD29 e fracamente positivas para o receptor de hialuronato CD44. As células foram negativas para marcadores de células hematopoiéticas como o receptor de polissacarídeo CD14, o antígeno comum de leucócitos CD45 e o marcador de célula endotelial CD31. Também houve marcação acima de 10% para o CD34, um marcador de células progenitoras hematopoiéticas, em duas das três amostras.

Tabela 14 – Expressão dos antígenos de superfície celular das amostras de CTMs isoladas da medula óssea de três animais, analisados por citometria de fluxo.

Amostra	CD 29	CD 31	CD 45	CD 166	CD 34	CD 73	CD 105	CD 44	CD 14
G1	25,10%	3,65%	2,84%	2,01%	3,93%	2,24%	19,30%		
G2	23,30%	0,29%	0,12%		13,03%	4,08%	26,20%	5,82%	
G3	17,78%	0,65%	0,24%		21,10%	0,94%	17,95%	5,49%	1,01%
Média	22,06%	1,53%	1,06%		12,68%	2,42%	21,15%	5,65%	

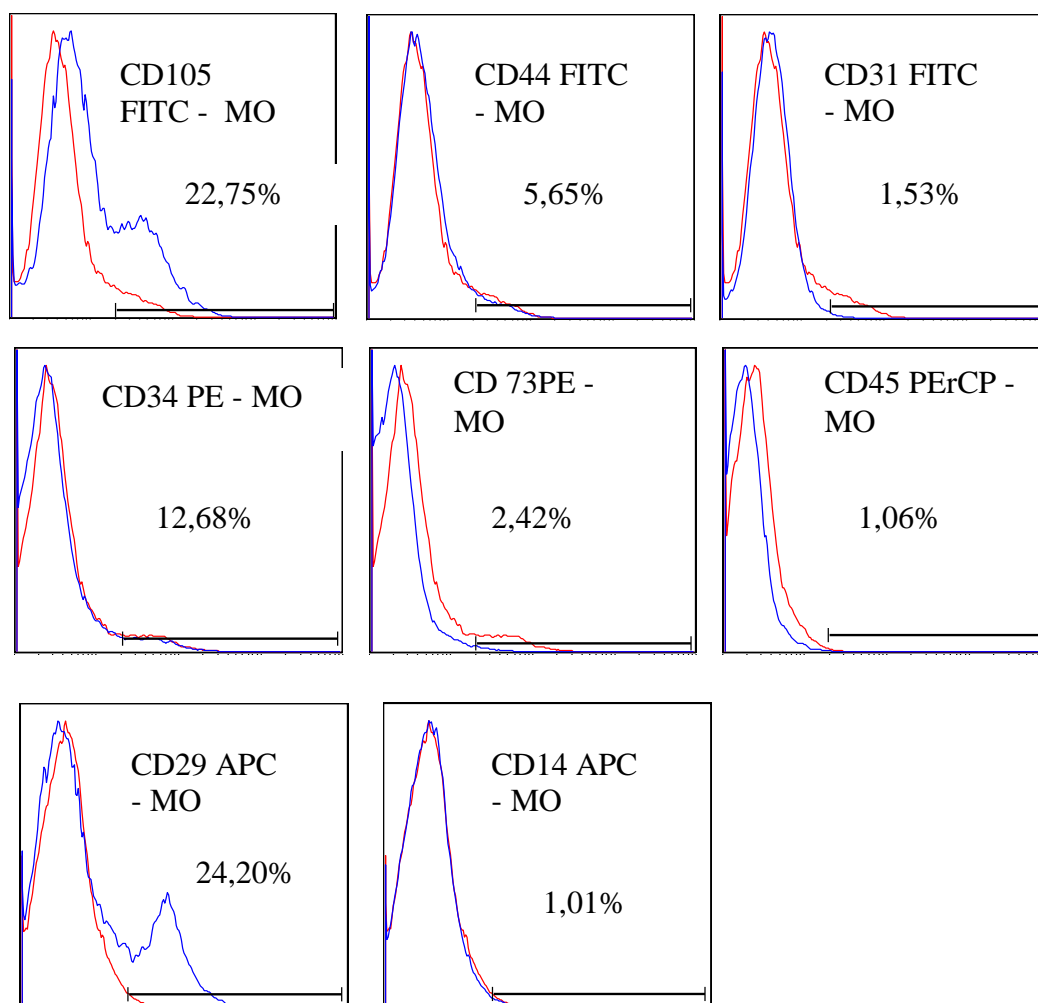


Figura 26 – Histogramas representativos das expressões de antígenos de superfície celular analisadas por citometria de fluxo. As CTMs isoladas de medula óssea foram marcadas com anticorpos contra os antígenos indicados e analisados por citometria de fluxo. O eixo Y representa a % máxima de células analisadas e no eixo x a intensidade de fluorescência em escala log ($10^0 - 10^4$). O controle isotípico é demonstrado pela linha vermelha.

3.4.2 CTMs isoladas do Tecido Adiposo

A expressão dos antígenos de superfície celular foi analisada por citometria de fluxo em três amostras de tecido adiposo coletadas em P3 ou P4. Com poucas exceções, as três amostras demonstraram similaridade imunofenotípica para os marcadores analisados (Tabela 15 e Figura 27). As células foram fracamente positivas para o receptor endoglina CD 105 e uma amostra para a integrina $\beta 1$ CD29. As células foram negativas para os marcadores de células hematopoiéticas como o antígeno comum de leucócitos CD45 e o marcador de células endoteliais CD31.

Tabela 15 – Expressão dos antígenos de superfície celular das amostras de CTMs isoladas do tecido adiposo de três animais, analisadas por citometria de fluxo.

Amostra	CD 29	CD 31	CD 45	CD 166	CD 34	CD 73	CD 105
G4	9,57%	0,61%	1,45%	0,76%	2,53%	3,44%	5,11%
G5	0,59%	2,09%	1,87%	2,01%	0,62%	1,81%	7,18%
G6	2,18%	0,45%	0,87%	0,57%	2,80%	5,02%	11,30%
Média	4,11%	1,05%	1,39%	1,11%	1,98%	3,42%	7,86%

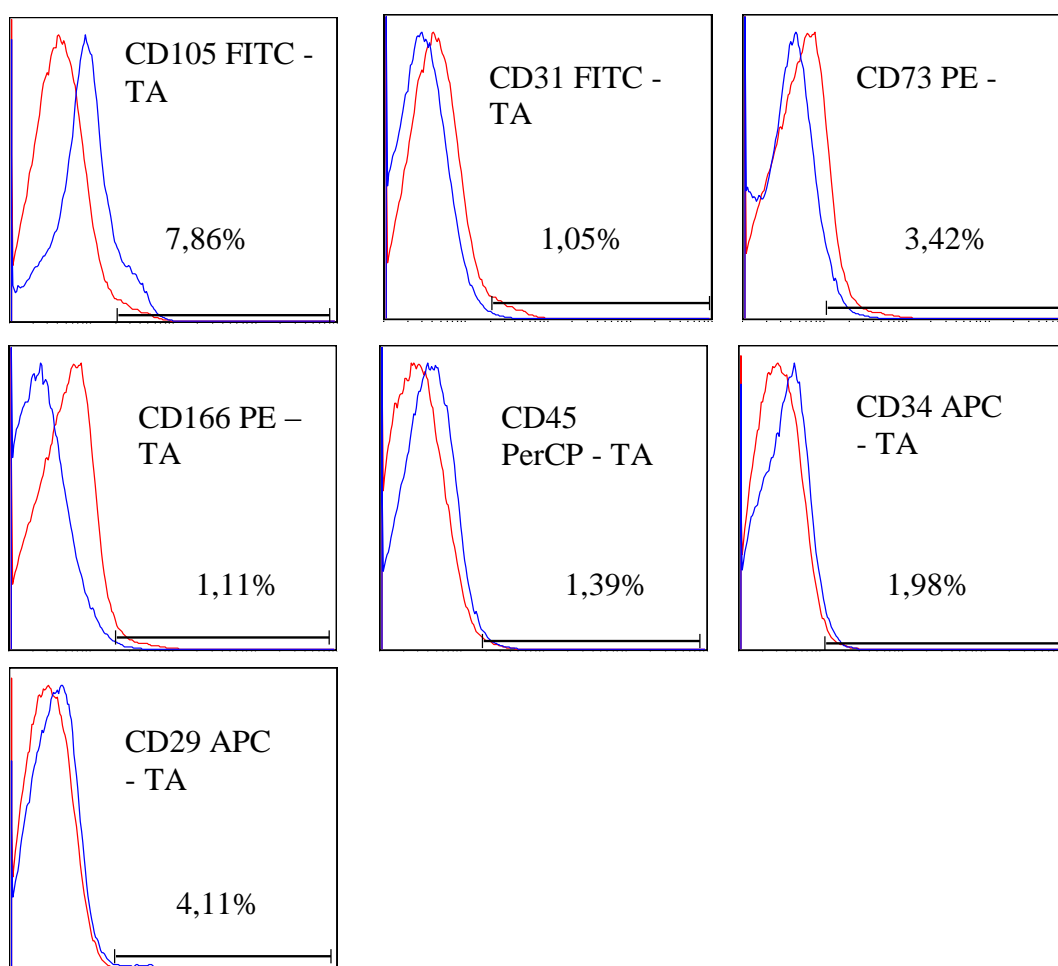


Figura 27 – Histogramas representativos das expressões de antígenos de superfície celular analisadas por citometria de fluxo. As CTMs isoladas do tecido adiposo foram marcadas com anticorpos contra os antígenos indicados e analisados por citometria de fluxo. O eixo Y representa a % máxima de células analisadas e no eixo x a intensidade de fluorescência em escala log (10^0 – 10^4). O controle isotípico é demonstrado pela linha vermelha.

3.5 ENSAIOS CLONOGÊNICOS DE CFU-F

3.5.1 CTMs isoladas da MO

Para avaliar a frequência de progenitores mesenquimais presente nas amostras de medula óssea foi observado a habilidade destas células em formar colônias fibroblásticas utilizando os ensaios de CFU-F. As colônias obtidas variaram no tamanho quanto na morfologia (Figura 28).

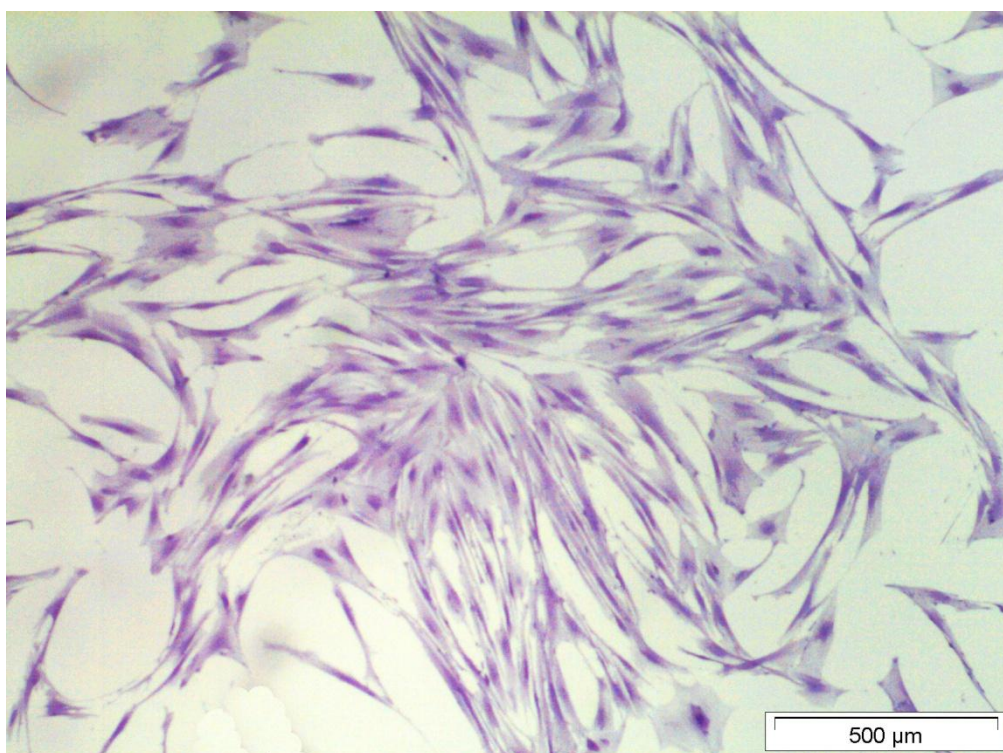


Figura 28 - CFU-F obtida da cultura das células tronco mesenquimais da MO, após 14 dias de cultura, passagem 3, aumento de 40x. Barra = 500 μm .

A média do número de colônias em cada passagem está representada no gráfico 1. A média do número de CFU-F observadas após a cultura de 470 células mesenquimais/ cm^2 e 752 células/ cm^2 obtidas da MO, considerando as passagens P1 e P3, de três amostras, foi de $8,58 \pm 6,16$ e $16,26 \pm 9,25$, respectivamente.

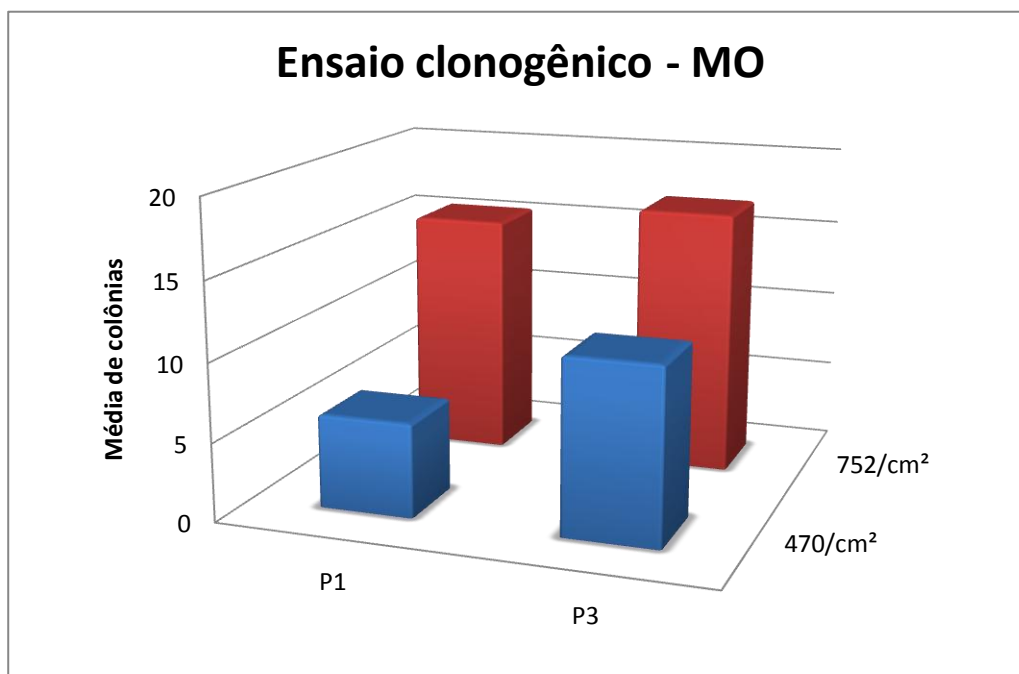


Gráfico 1 - Número de CFU-F obtidas após o plaqueamento de 470 células mesenquimais/cm² e 752 células/cm², nas diferentes passagens. Os resultados representam a média das culturas obtidas de 3 amostras de medula óssea.

3.5.2 CTMs isoladas do TA

Para avaliar a frequência de progenitores mesenquimais presente nas amostras de tecido adiposo foi observada a habilidade destas células em formar colônias fibroblásticas utilizando os ensaios de CFU-F. Como nas amostras da MO, as colônias obtidas variaram no tamanho e morfologia (Figura 29).

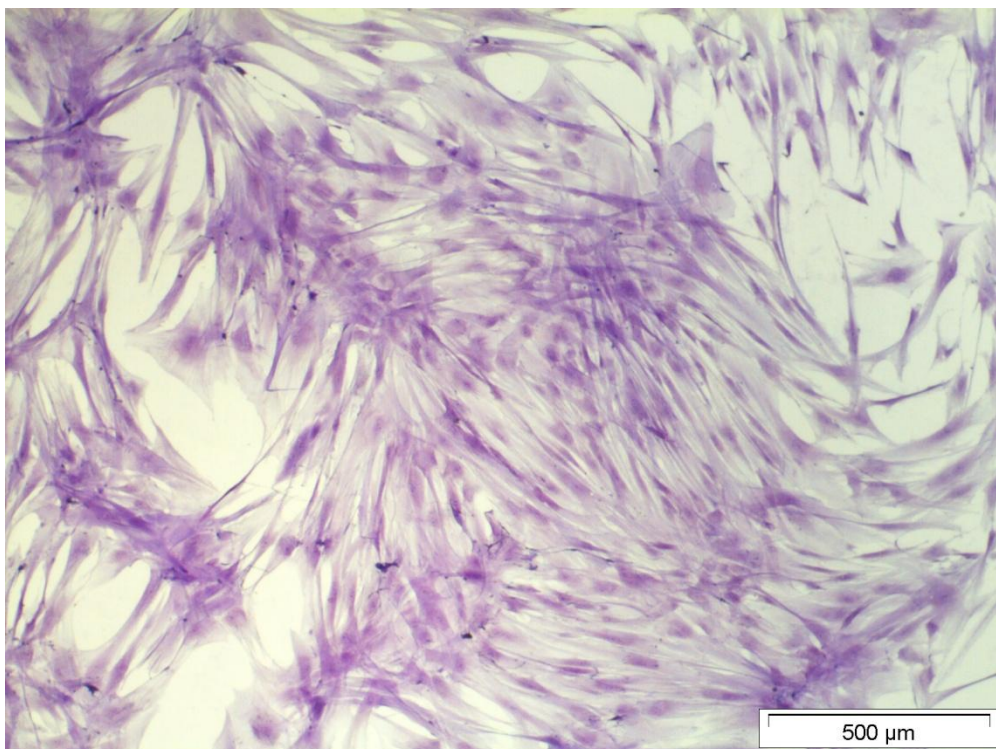


Figura 28 - CFU-F obtidas da cultura das células tronco derivadas do tecido adiposo, após 14 dias de cultura, passagem 3, aumento de 40x. Barra = 500 μm .

A média do número de colônias em cada passagem está representada no gráfico 2. A média do número de CFU-F observadas após a cultura de 470 células mesenquimais/ cm^2 e 752 células/ cm^2 obtidas do tecido adiposo, considerando as passagens P1 e P3, de duas amostras, foram $20,62 \pm 16,38$ e $21,87 \pm 17,64$ colônias, respectivamente.

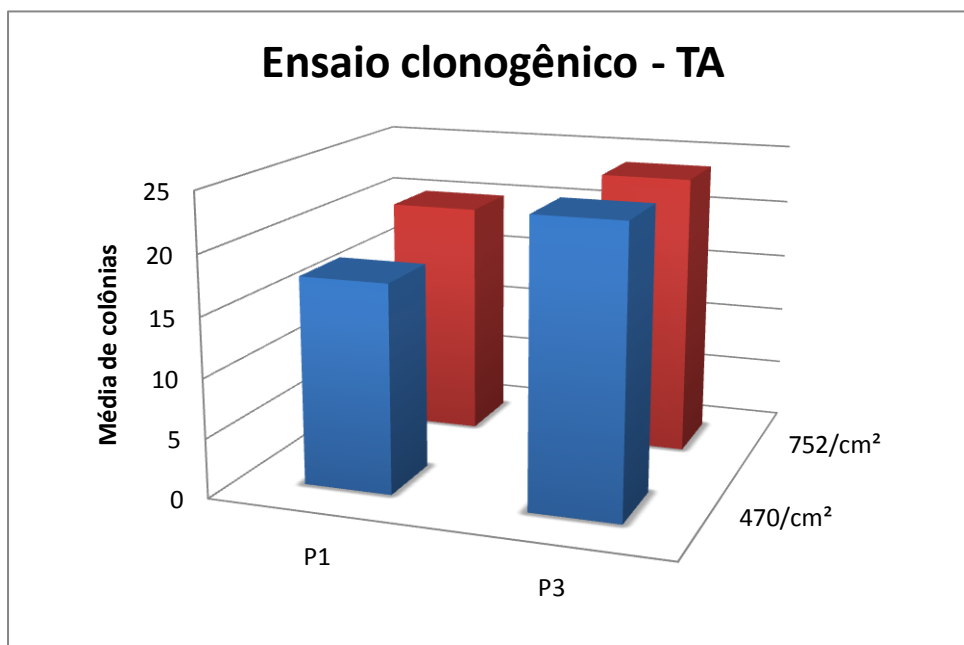


Gráfico 2. Número de CFU-F obtidas após o plaqueamento de 470 células mesenquimais/cm² e 752 células/cm², nas diferentes passagens. Os resultados representam a média das culturas obtidas de 2 amostras de tecido adiposo.

4 - DISCUSSÃO

No presente trabalho as células tronco mesenquimais isoladas da MO e do TA de gatos diferenciaram-se em osteoblastos, condrócitos e adipócitos. De acordo com a “*International Society for Cellular Therapy*” (ISCT), há três critérios mínimos para uma população de células ser classificada como CTMs e um deles é a diferenciação nas três linhagens (DOMINICCI *et al.*, 2006). A plasticidade dos progenitores mesenquimais é primordial para futuras estratégias terapêuticas em terapia celular e engenharia tecidual (REBELATTO *et al.*, 2008).

Outro critério de definição de CTM é que estas células devem ser isoladas de uma população de células mononucleares com base à sua aderência à superfície do plástico em cultura (DOMINICCI *et al.*, 2006). A eficiência de obtenção das CTMs derivadas da MO foi de 85% (12 em 14 amostras) e de 80% (4 em 5 amostras) nas

células derivadas do TA. REBELATTO *et al* (2008) relataram 100% de sucesso no isolamento e estabelecimento de cultivo das CTMs isoladas da MO e TA de humanos adultos.

Neste estudo, foram obtidas em média $12,2 \pm 6 \times 10^6$ células mononucleares por mL da MO nos aspirados de MO de gatos adultos. VIDAL *et al* (2006) obtiveram $6,4 \pm 3,4 \times 10^6$ de células nucleadas por mL. Estudos com defeitos ósseos críticos em cães demonstraram que 15 milhões de células por mL de volume transplantado foi suficiente para obter melhora significativa na produção óssea e na regeneração (BRUDER, 1998).

O volume médio das amostras de tecido adiposo coletadas foi de 4,62 gramas por cirurgia e o número de células isoladas foi em média de 284.070 células por grama de tecido. Em um estudo com cães, foram obtidas uma média de 528.000 células/g de tecido adiposo coletado (NEUPANE *et al*, 2008). COLLEONI *et al* (2009) obtiveram CTMs do tecido adiposo de 11 cavalos, com média de 209.241 células/g, em uma média 14,36 g de tecido adiposo coletado. FRASER *et al* (2008) e colaboradores relataram uma média de $2,9 \times 10^6 \pm 0,4/\text{ml}$ de tecido adiposo em humanos adultos com menos de 27 anos, $1,8 \times 10^6 \pm 0,7$ em humanos obesos e 5-10 milhões/ml em porcos. Até o presente, não foram encontrados relatos sobre isolamento de CTMs de tecido adiposo de gatos.

Os ensaios funcionais são importantes para caracterizar a população de células mesenquimais com que se está trabalhando, pois não há marcadores moleculares específicos e universais para as CTMs (DOMINICCI *et al.*, 2006). Neste estudo, os ensaios qualitativos demonstraram *in vitro* o potencial de diferenciação das células cultivadas derivadas da MO e TA em três linhagens celulares (osteoblastos, condrócitos e adipócitos). O potencial de diferenciação em múltiplas

linhagens celulares das CTMs isoladas do TA de gato, não havia sido relatado anteriormente, apenas demonstrado em humanos (REBELLATO *et al.*, 2008), ratos (HICOK *et al.*, 2004; CASE *et al.*, 2005) cavalos (COLLEONI, 2009) e cães (NEUPANE, 2008).

As CTMs isoladas do TA e da MO foram capazes de proliferar e posteriormente se diferenciar em osteoblastos. A incubação com meio de diferenciação induziu a agregação celular e a produção de matriz, que foi corada positivamente com o marcador específico de cristais de cálcio, o vermelho de Alizarina. A osteogênese *in vitro* de células tronco mesenquimais obtidas da MO já foi demonstrada em frangos, camundongos, ratos, coelhos, porcos (JAISWAL *et al.*, 1997), seres humanos (MAJORS *et al.*, 1997), cavalos (ARNHOLD *et al.*, 2007), cães (VOLK *et al.*, 2005) e gatos (MARTIN *et al.*, 2002), em resposta a diversos fatores bioativos incluindo osteogenina, BMP-2, peptídeos de crescimento osteogênico, o glicocorticóide sintético dexametasona (JAISWAL *et al.*, 1997), ácido ascórbico, β glicerolfosfato (KWAN *et al.*, 2007) e flavonóides da erva *Herba Epimedii* (ZHANG *et al.*, 2009).

Neste estudo as células de ambas as fontes também se diferenciaram em adipócitos. As células diferenciadas foram identificadas pela presença de vacúolos de lipídeos no citoplasma das células, coradas em vermelho com o corante Oil Red (MARTIN *et al.*, 2002; VIDAL *et al.*, 2006; ARNHOLD *et al.*, 2007; REBELATTO *et al.*, 2008).

As células cultivadas na presença do TGF- β desenvolveram características morfológicas típicas de condrócitos e apesar de ter sido descrita em outros modelos animais a diferenciação condrogênica das CTMs isoladas da MO e do TA ainda não foi relatada em gatos. O corte histológico dos botões celulares apresentou estrutura

condensada com células cubóides e lacunas de condrócitos. As células coraram positivamente com Azul de Toluidina. Este corante é específico para os proteoglicanos sulfatados da matriz cartilaginosa (REBELLATO *et al.*, 2008; ARNHOLD *et al.*, 2007). Martin *et al* (2002) demonstraram a diferenciação das CTMs isoladas da MO de gatos em osteoblastos, adipócitos e neurônios, mas não relataram a diferenciação em condrócitos.

As avaliações de morfologia celular e de morfometria das células tronco mesenquimais isoladas da MO e do TA foram realizadas para a caracterização das células. Esta é importante para confirmar a espécie de origem, identificar a linhagem celular, a posição da célula dentro da linhagem (precursora ou *status* diferenciado) e se apresentam características de malignidade (FRESHNEY, 2005). O controle da morfologia celular, do tamanho das células e organelas são importantes para o desenvolvimento da diferenciação celular e dos órgãos e tecidos (KHARITONOVA & VASILIEV, 2008).

As células fibroblastóides, fusiformes, com largura média menor e alongadas com comprimento médio maior e as células pavimentosas com largura maior e menor comprimento predominavam nos cultivos do ensaio de morfologia das amostras de medula óssea e tecido adiposo, em consonância com o trabalho de VIDAL *et al* (2006), que também observaram as mesmas características das CTMs de cavalos, porém não foram feitas medidas das células neste trabalho. Verificou-se que essas células apresentavam diferentes formas de projeções de seus citoplasmas. Nos ensaios da morfologia da MO algumas células menores, esféricas, núcleo excêntrico, citoplasma com intensa basofilia, provavelmente célula da linhagem hematopoiética, foram encontradas freqüentemente em placas de P1 e raramente em placas de P3. Também foram encontrados alguns osteoclastos

grandes, com até 343,9 μm de comprimento e 159,8 μm de largura (dados não apresentados), multinucleados. Células multinucleadas também aparecem raramente nos cultivos da MO e do TA. Em cultivo, as CTMs de humanos, de camundongos e de cães são fibroblásticas (BARRY & MURPHY, 2004; CSAKI *et al.*, 2007; DVORAKOVA *et al.*, 2008; SUNG *et al.*, 2008). Entretanto, o estudo morfométrico das células não foi realizado.

Em relação aos marcadores de superfície para a caracterização das CTMs de animais, há uma grande dificuldade, pois existe pouca disponibilidade de marcadores comerciais para as diferentes espécies animais e nem todos os marcadores utilizados na caracterização das CTMs de humanos e murinos apresentam reação cruzada com as outras espécies (TAPP *et al.*, 2009).

Neste estudo foram utilizados marcadores para células humanas, os quais apresentaram reações cruzadas com as CTMs de gato. As amostras de MO marcaram positivamente para CD 105 e CD 29 e negativamente para os CD 31, CD 45, CD 73, CD 166, CD 44 e CD 14. As amostras do TA foram negativas (1,98%) em relação ao marcador CD 34 enquanto na MO, 12,68% das células foram positivas para o mesmo marcador. O marcador CD 34 é uma glicoproteína de superfície celular presente em células tronco ativadas (GOODELL *et al.*, 2001) e tem sido utilizada como marcador de células tronco hematopoiéticas. Porém, ele também está expressos nas células progenitoras endoteliais e progenitoras estromais fetais e adultos (OKUNO *et al.*, 2002). A maior porcentagem do marcador CD 34 observada na população de CTMs da MO pode ser devido a contaminação com as células da linhagem hematopoiética. A menor porcentagem de células marcadas em relação aos critérios estabelecidos pela ISCT com células humanas, pode ser explicado pela baixa especificidade dos antígenos humanos utilizados nas células de gatos. No

trabalho de MARTIN *et al* (2002), no qual os autores utilizaram marcadores específicos de gatos, foi demonstrado que as células marcaram positivamente para CD 9, CD 44 e MHC-I e negativamente para CD 45.

As células do TA marcaram, ainda que discretamente, para CD 105 e negativamente para CD 45 e CD 34. Uma amostra teve marcação discreta para CD 29 (9,57%). ZHANG *et al* (2007) observaram que em amostras de terceira passagem, isoladas do tecido adiposo de cães, foram positivas para os marcadores CD29 e CD44.

Tanto para as amostras de MO e TA, foram utilizados anticorpos marcadores de células humanas, devido a escassez de marcadores para gatos e o alto custo. Experimentos futuros utilizando marcadores de superfície para gatos serão realizados para verificar se os resultados obtidos são semelhantes. Diversos fatores, como métodos de isolamento, tipo de superfície de cultura, meio de cultura, densidade da semeadura, tratamento com diferentes fatores de crescimento e produtos químicos, afetam não somente a expansão das CTMs, mas também a diferenciação. A idade do doador de células, presença ou estágio de doença também podem influenciar nas características das CTMs (BYDLOWSKI *et al.*, 2009). Esse estudo demonstrou que as células isoladas da MO e do TA de gatos realmente eram tronco mesenquimais devido a sua aderência ao plástico, morfologia fibroblastóide, diferenciação em três linhagens e a positividade para os marcadores de superfície CD 105 e CD 29 e negatividade para os marcadores de células hematopoiéticas CD 45 e para o TA o marcador CD 34.

As informações referentes aos aspectos de morfologia e morfometria das CTMs da MO e TA de gatos não foram encontradas na literatura. Ambas serão importantes para futuras investigações qualitativas dessas células.

Em relação aos ensaios de CFU-F, tanto para as amostras de MO como TA, foi observada uma variação do número de CFU-F nos ensaios realizados neste estudo o que está de acordo com o trabalho de Wellman e Kociba, 1988, que também relataram uma variabilidade no número de colônias nos ensaios com felinos e que foi semelhante aos demonstrados nos ensaios de seres humanos.

A maior frequência de CFU-F das células derivadas do TA comparativamente com células derivadas da MO, observadas neste estudo, também está de acordo com os dados da literatura. Considerando-se que a frequência das células tronco mesenquimais no TA é maior que na MO em humanos, a frequência de CFU-F no TA também deve ser maior que na MO, como demonstrado por Fraser et al., 2008.

A eficiência na formação de colônias obtidas de cada passagem, reflete a capacidade de expansão das células tronco mesenquimais nas amostras de MO e TA. Em amostras com baixos números de CFU-F, as células provavelmente duplicam várias vezes antes de alcançar a confluência no primeiro plaqueamento e têm um potencial limitado para futuras expansões (Di Girolamo, et al., 1999). Devido ao maior número de CFU-F obtidas das células do TA, sugere-se que estas células tenham um potencial de expansão melhor que as células da MO em felinos. Desta forma os ensaios de CFU-F poderiam ser úteis na identificação de amostras que teriam grande potencial proliferativo e que poderiam ser utilizadas em ensaios clínicos.

5 CONCLUSÃO

- As células tronco mesenquimais podem ser isoladas de medula óssea e tecido adiposo de gato, expandidas conforme protocolo estabelecido e são capazes de se diferenciarem em osteoblastos, condrócitos e adipócitos.
- Nos cultivos de células tronco mesenquimais existem dois tipos celulares predominantes. As fusiformes e as pavimentosas, com variações em suas morfometrias e formas.
- As células tronco mesenquimais isoladas da medula óssea marcaram positivamente para os marcadores humanos CD 105 e CD 29 e fracamente para CD34.
- As células tronco mesenquimais isoladas do tecido adiposo marcaram, ainda que discretamente, para CD 105 e negativamente para CD 45 e CD 34.

REFERÊNCIAS

ARNHOLD, S.J. ; GOLETZ, I. ; KLEIN, H. ; STUMPF, G. ; BELUCHE, L.A. ; ROHDE, C. ; ADDICKS, K. ; LITZKE, L.F. Isolation and characterization of bone marrow–derived equine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 68, n. 10, p. 1095-1105, 2007.

ASHTON, B. A. ; ALLEN, T. D. ; HOWLETT, C. R. ; EAGLESOM, C. C. ; HATTORI, A. ; OWEN, M. Formation of bone and cartilage by marrow stromal cells in diffusion chambers in vivo. **Clinical orthopaedics and related research**, v.151, p. 294–307, 1980.

BAJADA, S. MAZAKOVA, I. ; RICHARDSON, J.B. ; ASHAMMAKHI, N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 2(4), p. 169-183, 2008.

BANFI, A. ; MURAGLIA, A. ; DOZIN, B. ; MASTROGIACOMO, M. ; CANCEDDA, R. ; QUARTO, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: implications for their use in cell therapy. **Experimental Hematology**, v. 28, p. 707-715, 2000.

BARRY, F. P.; MURPHY, J. M. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.36, p.568-584, 2004.

BERNÁ, G. ; QUINTO-LEÓN, T. ; ENSEÑAT-WASER, R. ; MONTANYA, E. ; MARTÍN, F. ; SORIA, B. Stem cells and diabetes. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 55, p. 206-212, 2001.

BIANCO, P. ; ROBEY, P. G. Skeletal stem cells. In: Lanza, R.P. **Handbook of Adult and Fetal Stem Cells**. EUA: Academic Press, San Diego, CA, p. 415–424, 2004.

BRUDER, S, P.; KRAUS, K, H.; GOLDBERG, V, M. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. **Journal of Bone and Joint Surgery**, 80: p. 985 – 996,1998.

BRUDER, P.S ; KURTH, A.A ; SHEA, M. ; HAYES, C.W.; JAISWAL, N.; KADIYALA,S. Bone Regeneration by Implantation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells. **Journal of Orthopedic Research**, v. 16, n.2, p. 155-162 , 1998.

BUTTERY, L.D. ; BOURNE, S. XYNOS, J.D. ; WOOD, H. ; HUGHES, F.J. ; HUGHES, S.P. ; EPISKOPOU, V. ; POLAK, J.M. Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells. **Tissue Engineering**, v. 7, p. 89-99. 2001.

BYDŁOWSKI, S, P.; DEBES, A, A.; MASELLI, L, M, F.; JANZ, F, L. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**: 31(Supl. 1): p. 25- 35, 2009.

CAPLAN, A.I. Mesenchymal Stem Cells. In: LANZA, R.; GEARHART, J.; HOGAN, B.; MELTON, D.; PEDERSEN, R.; THOMAS, E.D.; THOMSON, J.; WEST, M. **Essentials of Stem Cell Biology**. 1. ed. Elsevier Academic Press, p. 205-210, 2006.

CASE, J.; HORVATH, T.; HOWELL, J, C.; YODER, M, C.; MARCH, K, L.; SROUR, E, F. Clonal multilineage differentiation of marine common pluripotent stem cells isolated from skeletal muscled and adipose stromal cells. **Ann. N. Y. Acad. Sei:** v.1044, p. 183- 200, 2005.

COLLEONI, S.; BOTTANI, E.; TESSARO, I.; MARI, G.; MERLO, B.; ROMAGNOLI, N.; SPADARI, A.; GALLI, C.; LAZZARI, G. Isolation, growth and differentiation of equine mesenchymal stem cells: effect of donor, source, amount of tissue and supplementation with basic fibroblast growth factor. **Veterinary Research Communications**, v.33, n.8, p.811-821, 2009.

CSAKI, C.; MATIS, U.; MOBASHERI, A.; YE, H.; SHAKIBAEI, M. Chondrogenesis, osteogenesis and adipogenesis of canine mesenchymal stem cells: a biochemical, morphological and ultrastructural study. **Histochemistry and Cell Biology**, v.128, p. 613-622, 2008.

DIGIROLAM, C.; STOKES, D.; COLTER, D.; PHINNEY, D, G.; CLASS, R.; PROCKOP, D, J. Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. **British Journal of Haematology**, v. 107, p. 275-281, 1999.

DOMINICI, M.; LE BLANC, K.; MULLER, E.; SLAPER-CORTENBACH, I.; MARINI, F.; KRAUSE, D.; DEANS, R.; KEATING, A.; PROCKOP, D.; HORWITZ, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. **Cytotherapy**, v.8, p. 315-317, 2006.

DVORAKOVA, J.; HRUBA, A.; VELEBNY, V.; KUBALA, L. Isolation and characterization of mesenchymal stem cell population entrapped in bone marrow collection sets. **Cell Biology International**, v.32, p.1116-1125, 2008.

IM, G-II.; SHIN, Y-W.; LEE, K-B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? **Osteoarthritis and Cartilage**, v.13, p.845-853, 2005.

FRASER, J, K.; ZHU, M.; WULUR, I.; ALFONSO, Z. Adipose-Derived Stem Cells. PROKOP, D, J.; PHINNEY, D, G.; BUNNELL, B, A. **In: Mesenchymal Stem Cells Methods end Protocols**. New Orleans, EUA: Humana Press, cap. 4, p. 59- 68, 2008.

FRESHNEY, R. I. Subculture and cell lines. In: FRESHNEY, R.I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. Nova Jersey, EUA: John Wiley & Sons, Inc., cap. 13, p. 199-246, 2005.

FRIEDENSTEIN, A. J. ; PIATETZKY-SHAPIRO, I. I. ; PETRAKOVA, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. **Journal of embryology and experimental morphology**, v.16, 381–390, 1966.

FRIEDENSTEIN, A.J. ; CHAILAKHJAN, R.K. ; LALYKINA, K.S. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. **Cell and tissue kinetics**, v. 3, p. 393–403, 1970.

GOODELL, M. A.; JACKSON, K.A.; MAJKA, S.M.; MI, T.; WANG, H.; POCIUS, J.; HARTLEY, C.J.; MAJESKY, M.W.; ENTMAN, M.L.; MICHAEL, L.H.; HIRSCHI, K.K. Stem cell plasticity in muscled and bone marrow. **Ann N Y Acad Sci**: v. 938, p. 208-218, 2001.

GRITTI, A. ; VESCOLI, A.L. ; GALLI,R. Adult neural stem cells plasticity and developmental potential. **Journal of physiology Paris**, v. 96(1-2), p.81-89, 2002.

GUILAK, F.; LOTT, K, E.; AWAD, H, A.; CAO, Q.; HICOK, C.; FERMOR, B.; GIMBLE, J, M.; Clonal analysis of the diferentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. **Journal of Cell Physiology**: v. 206, p. 229-237, 2006.

JAISWAL, R, K.; JAISWAL, N.; BRUDER, S.P.; MBALAVIELE, G.; MARSHAK, D.R.; PITTENGER, D.R. Adult human mesenchymal stem cell differentiation to the osteogenic or adipogenic lineage is regulated by mitogen-activated protein kinase. **The Journal of Biological Chemistry**: v. 275, p. 9645-9652, 2000.

JAISWAL, N. ; HAYNESWORTH, S.E. ; CAPLAN, A.I. ; BRUDER, S. P. Osteogenic Differentiation of Purified, Culture-Expanded Human Mesenchymal Stem Cells In Vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 64, p. 295–312, 1997.

KWAN, D.M. ; WAN, D.C. ;LONGAKER, M.T. Skeletal-Tissue Engineering. In: LANZA, R. ; LANGER,R. ; VACANTI, J. **Principles of Tissue Engineering**, 3 ed. , San Diego, Elsevier Academic Press, cap. 62, p. 935-944, 2007.

KREBSBACH, P. H. ; KUZNETSOV, S. A. ; SATOMURA, K. ; EMMONS, R. V. ; ROWE, D. W. ; ROBEY, P. G. Bone formation in vivo: Comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. **Transplantation**, v. 63, p.1059–1069, 1997.

MAJORS, A.K. ; BOEHM, C.A. ; NITTO, H. ; MIDURA, R.J. ; MUSCHLER, G.F. Characterization of Human Bone Marrow Stromal Cells with Respect to Osteoblastic Differentiation. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 15, n. 4, p. 546-557, 1997.

MARTIN, D.R. ; COX, N.R. ; HATHCOCK, T.L. ; NIEMEYER, G.P. ; BAKER, H.J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. **Experimental Hematology**, v. 30, p. 879–886, 2002.

MEIRELLES, L da S.; CAPLAN, A, L.; NARDI, N, B.; In search of the in vivo identify of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v. 9, n. 26, p. 2287-2299, 2008.

MEIRELLES, L da S.; NARDI, N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation in vitro expansion, and characterization. **British Journal of Haematology**, v. 123(4), p. 702-711, 2003.

MURAGLIA, A.; CANCEDDA, R.; QUARTO, R,. Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. **Journal of Cell Science**, n. 113, p. 1161-1166, 2000.

NEUPANE, M.; CHANG, C.; KIUPEL, M.; YUZBASIYAN-GURKAN, V. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cell. In: **Tissue Engineering**: Part. A, v.14, n.6, p.1007-1015, 2008.

ODORICO, J.S.; KAUFMAN, D.S.; THONSON,J.A. Multilineage differentiation from human embryonic stem cells lines. **Stem Cells**, v. 19, p.193-204, 2001.

OKUNO, Y.; IWASAKI.; HUETTNER, C.S.; RADOMSKA, H.S.; GONZALEZ, D.A.; TENEN, D.G.; AKASHI, K. Differential regulation of the human and murine CD34 genes in hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA**: v 99, p 6246-6251, 2002.

OWEN, M. ; FRIEDENSTEIN, A. J. Stromal stem cells: Marrow-derived osteogenic precursors. **Ciba Foundation symposium**, v. 136, p. 42–60, 1988.

OWENS, M, A.; VALL, H, G,.; HURLEY, A, A.; WORMSLEY, S, B. Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. **Journal of Immunology Methods**: 243: 33-50, 2000.

REBELATTO, C, K.; AGUIAR, A, M.; MORETA P, M.; SENEGAGLIA, A, C.; HANSEN, P, BARCHIKI, F.; OLIVEIRA, J.; MARTINS, J.; KULIGOVSKI, C.; MANSUR, F.; .CHRISTOFIS, V, F.; AMARAL, P, S.; BROFMAN, S.; GOLDENBERG, L,S.; NAKAO, A, N, D.; CORREA, A.; STRUTT, B.; KHALIL, W.; KILLINGER, D. Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, and Adipose Tissue. **Experimental Biology and Medicine**, v. 233: p. 901–913, 2008.

SUNG, J.H.; YANG, H.-M.; PARK, J.B.; CHOI, G.-S.; JOH, J.-W, KWON, C.H.; CHUN, J.M., LEE, S.-K.; KIM, S.-J. Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation proceedings**, v. 40, p.2649-2654, 2008.

TAPP, H.; HANLEY, E. N.; PATT, J. C.; GRUBER, H. E. Adipose-derived stem cells: characterization and current application in orthopedic tissue repair. **Experimental Biology and Medicine**: v.234, p.1-9, 2009.

VIDAL, M. A.; KILROY, G. E.; LOPEZ, M. J.; JOHNSON, J. R.; MOORE, R. M.; GIMBLE, J. M. Characterization of equine adipose tissue-derived stromal cells: adipogênica and osteogênica capacity and comparison with bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. **Veterinary Surgery**, v. 36, p.613-622, 2007.

VOLK, S.W. ; DIEFENDERFER, D.L. ; CHRISTOPHER, S.A. ; HASKINS, M.E. ; LEBOY, P.S. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 10, p. 1729-1737, 2005.

VOGEL,G. Can old cells learn new tricks. **Science**, v. 278, p. 1418-1419, 2000.

WELLMAN, M, L. KOCIBA, G, J. Characterization of fibroblast colony-forming units in bone marrow from healthy cats. **American Journal of Veterinary Research**, n. 49, v. 2, p. 231-235.

WHATT,F.M.; HOGAN,B.L.M. Out of the Éden: stem cells and their niches. **Science**, v. 278, p.1427-1430, 2000.

ZANJANI, E.; WERNET, P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, p. 123-135, 2004.

ZHANG, J.F. ; LI, G. ; MENG,C.L. ; DONG, Q. ; CHAN, C.Y. ; He, M.L. ; LEUNG, P.C, ZHANG, Y.O. ; KUNG, H.F. Total flavonoids of Herba Epimedii improves osteogenesis and inhibits osteoclastogenesis of human mesenchymal stem cells. **Phytomedicine**, v.16, p. 521–529, 2009.

ZHANG, Z.Q.; JIN, Y.; LI, Y.Q.; ZHANG, Y.J. Isolation, culture and multi-directional differentiation potency of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research**, v.11, n.42, 2007.

ZUK, P, A.; ZUH, M.; MIZUNO, H.; HUANG,J.; FUTRELL, J, W.; KATZ, A, J.; BENHAIM, P.; LORENZ, H, P.; HEDRIK, M, H. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cells- based therapies. **Tissue Engineering**: v. 7, p. 211-228, 2001.